

THESIS

GIESSEN

1967

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

**Beeinflussung der Myxovirus-Vermehrung
durch Basenanalogue und Acridinderivate**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen**

Eingereicht von
Günter Hahn
Tierarzt aus Gießen

Gießen 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153519_0008

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

**Beeinflussung der Myxovirus-Vermehrung
durch Basenanalogue und Acridinderivate**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen**

Eingereicht von
Günter Hahn
Tierarzt aus Gießen

Gießen 1967

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Prof. Dr. F. U l b r i c h

Berichterstatter: Prof. Dr. R. R o t t

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 1967

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
1. Beeinflussung der Nucleinsäuresynthese durch Basenanaloge	3
2. Einfluß der Acridinfarbstoffe auf die Virusvermehrung	6
3. Affinität von Acridinorange zu Lyso-somen	10
II. Die Myxoviren	12
III. Chemotherapeutische Beeinflussung von Myxo-virus-Infektionen	13
IV. Material und Methoden	15
1. Virus	15
2. Zu untersuchende chemische Stoffe	15
a) Basenanaloge	15
b) Acridinfarbstoffe	16
c) Ein Pyrimidinabkömmling	16
3. Gewebekultur	17
a) Medium und Lösungen	17
b) Embryonale Hühnerzellen	18
c) Deckglaskulturen	18
d) HeLa-Zellen	18
4. Biologische Untersuchungsmethoden	19
a) Plaque-Test	19
b) Hämagglutinationsreaktion (HA-Reak-tion)	19
c) Komplementbindungsreaktion (KBR)	19
d) Seren	20
5. Dosiseffekt	20
6. Einfluß auf die Adsorptionsphase	22
7. Stundenwerte während des Infektions-zyklus	23

	Seite
8. Das Verhalten der Lysosomen während der Virusvermehrung	24
9. Lysosomenfärbung	25
V. Untersuchungsergebnisse	26
1. Versuche mit Basenanalogen	26
2. Versuche mit dem Pyrimidinabkömmling Persantin	27
3. Versuche mit Acridinfarbstoffen	27
a) Wirkung des Acridinoranges auf die Vermehrung des KP-Virus	27
b) Ergebnisse der Untersuchung der lysosomalen Enzyme während der Virusvermehrung unter Acridinorange	42
4. Wirkung des Proflavins auf die Vermehrung des KP-Virus	42
5. Wirkung des Proflavins auf die Vermehrung des NDV	57
VI. Besprechung der Untersuchungsergebnisse	61
VII. Zusammenfassung	72
VIII. Literaturverzeichnis	73

Lebenslauf

I. Einleitung und Problemstellung

Das Virus stellt ein Stück genetisches Material, Desoxyribonucleinsäure (DNS) oder Ribonucleinsäure (RNS) dar, das von einer Hülle aus Protein oder Lipoprotein umgeben ist. Die Vermehrung läuft im Innern der lebenden Zelle ab. Im Vermehrungszyklus des Virus unterscheidet man verschiedene Phasen. Das Virus kommt zunächst in Kontakt mit der Zelloberfläche und gelangt anschließend in das Zellinnere. Hier wird die Nucleinsäure, die die genetische Information trägt, von den umgebenden Hüllen befreit. Der nächste Schritt ist die Vervielfältigung der Nucleinsäure. Die neugebildete genetische Substanz wird in die chemischen Fließbänder der Zelle eingeführt. Da das Virus keine eigenen Stoffwechselenzyme besitzt, ist es bei seiner Vermehrung auf den Syntheseapparat der Zelle angewiesen. Unter Kontrolle des Virusgenoms werden die verschiedenen virusspezifischen makromolekularen Komponenten synthetisiert. Die Energie und die Bausteine zum Aufbau des Virusmaterials werden dem Zellstoffwechsel entnommen. Schließlich werden die Viruskomponenten zusammengesetzt und verlassen die Zelle.

Da die Virusvermehrung sehr eng an den Zellstoffwechsel gekoppelt ist, ist es schwierig, diesen Prozeß zu blockieren, ohne gleichzeitig lebenswichtige Funktionen der Zelle zu stören. Man braucht also Substanzen, die gezielt in die Biosynthese der Viren oder Viruskomponenten eingreifen, ohne die Zelle irreversibel zu schädigen.

Ein möglicher Angriffspunkt für solche selektiven Inhibitoren wäre dadurch gegeben, daß die Synthese der einzelnen Bausteine der Virusmoleküle von der der Zellprodukte verschieden ist. Ein weiterer spezifischer Unterschied liegt in der charakteristischen dreidimensionalen Struktur der Makromoleküle, die Strukturbestandteile des Virus sind oder eine biokatalytische Rolle im Vermehrungsprozeß spielen.

Ein Protein, dem eine solche biokatalytische Aufgabe zufällt, ist ein als Frühprotein bezeichneter virusinduzierter Eiweißstoff, der als Nucleinsäurepolymerase die Nucleotidtriphosphate zur Virusnucleinsäure verknüpft, ohne ein Strukturprotein des Virus zu sein. Durch Verwendung geeigneter Inhibitoren der Proteinsynthese kann der Aufbau dieses Enzyms gehemmt werden (Scholtissek u. Rott, 1961).

Eine weitere Möglichkeit der Hemmung ist der Eingriff in die Nucleinsäurereplikation der DNS-Viren. Öffnen sich die Wasserstoffbrücken der DNS-Doppelspirale wie ein Reißverschluß, so kann jede Base des Einzelstrangs aus dem Vorrat einzelner Nucleotide wieder einen passenden Partner aussuchen und an sich binden, wodurch unter Beteiligung von Enzymen neue Doppelstränge von Nucleotiden in richtiger Sequenz entstehen. Das Ergebnis ist eine Verdoppelung der ursprünglichen DNS-Doppelspirale (Bresch, 1965a).

Die RNS liegt meistens als Einzelstrang vor. Einzelheiten der RNS-Replikation werden noch diskutiert. Heute wird allgemein angenommen, daß die Vervielfältigung der RNS über ei-

ne replikative Doppelstrang-RNS abläuft, d.h. an dem ursprünglichen +Strang wird ein komplementärer oder -Strang synthetisiert. Der -Strang dient als Matrize für die Synthese neuer +Stränge. Es wird angenommen, daß für die beiden Syntheseschritte zwei verschiedene Enzyme notwendig sind (Lodish u. Zinder, 1966). Diesem Zwei-Enzym-Modell steht das von Spiegelman et al. (1965) vertretene Modell gegenüber. Diese Autoren konnten ein Enzym isolieren, das die Einzelstrang-RNS direkt zur Synthese identischer Einzelstrang-RNS-Moleküle benutzt.

1. Beeinflussung der Nucleinsäuresynthese durch Basenanaloge

Halogenierte Desoxypyrimidinbasen, wie 5-Jod-2'-Desoxyuridin (IUDR) und 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BUDR), haben nicht nur einen Effekt auf die DNS-Synthese von Bakterien und tierischen Zellen, sondern auch auf die Vermehrung der DNS bei animalen DNS-Viren, wie Adenoviren (Muntoni u. Loddo, 1963), SV 40 (Haas u. Maas, 1964), Vaccinia-Virus (Kaufmann, 1963a) und Herpesvirus (Kaufmann, 1963a,b).

Das 5-Jod-2'-Desoxyuridin, das als Modell für eine halogenierte Desoxypyrimidinbase stehen soll, wird durch Kinasen zum Triphosphat phosphoryliert und anstelle des Desoxythymidins 5'-triphosphats in die DNS eingebaut, was chemische und biologische Folgen hat. Der 5-Substituent des

5-Jod-2'-Desoxyuridins, das Jod, besitzt einen anderen van der Waal'schen Radius als die CH_3 -Gruppe des Thymidins, was zu einer gestörten Elektronenverteilung in der Nucleinsäure führt. Dieser Umstand bedingt eine deutliche Erhöhung des Schmelzpunktes der DNS-Helix. Mit dieser physiko-chemischen Änderung steigt offenbar der Widerstand, den die komplementären DNS-Stränge ihrer Trennung während der DNS-Replikation bieten. Diese Hinderung kommt in einer Hemmung der DNS-Synthese zum Ausdruck (Eggers u. Tamm, 1966).

Außerdem steigt die Mutationsrate an, was nach der Darstellung von Bresch (1965b) auf eine falsche Basenpaarung bei der DNS-Replikation zurückzuführen ist. Normalerweise wird das 5-Jod-2'-Desoxyuridin wie das Thymidin in der "Keto"-Form eingebaut und paart mit Adenin. Der Einbau in der "Keto"-Form hat für die Replikation keine fehlerhaften Konsequenzen. Durch tautomere Umlagerung bzw. eine Ionisierung des kritischen Profils, d.h. ihrer paarenden Seite, können Basen kurzzeitig in einen ungewöhnlichen Zustand übergehen. Gelegentlich kommt 5-Jod-2'-Desoxyuridin in dieser veränderten Form, in der seltenen "Enol"-Form, bei der Replikation vor und wählt Guanin statt Adenin als Basenpartner. Das Guanin verbindet sich in der nächsten Replikation mit dem Cytosin. Es ist eine A-T-Paarung in eine G-C-Paarung übergegangen, was eine Mutation bedeutet. Umgekehrt kann 5-Jod-2'-Desoxyuridin beim Einbau im "Enol"-Zustand vorliegen und mit Guanin paaren, d.h. ein Cytosin ersetzen. Da das eingebaute 5-Jod-2'-Desoxyuridin schnell in die "Keto"-Form zurückkehrt,

wird es bei folgenden Replikationen als Thymidin wirken und ein Adenin als Partner wählen. Es ist also ein G-C-Paar zu einem A-T-Paar mutiert. Solche fehlerhaften Basenpaarungen wirken sich über die Transcription und Translation der genetischen Information in einer Synthese funktionsuntüchtiger Proteine aus.

Der Einbau der Basenanalogen in der "Enol"-Form bzw. deren kurzzeitiger Übergang in diese Form während der Replikation führt zu einem veränderten Informationsgehalt der DNS, die in einer Funktionsuntüchtigkeit sowohl der Zell- wie auch der Virusproteine zum Ausdruck kommt und damit für die Zelle und das Virus letal sein kann.

Eine virusspezifische Selektivität, wie sie für die Therapie gefordert wird, besteht beim 5-Jod-2'-Desoxyuridin nur bedingt. Diese eingeschränkte Selektivität ergibt sich aus kinetischen und quantitativen Unterschieden zwischen der Zell- und der Virus-DNS-Synthese. Die Virus-DNS-Synthese verläuft kontinuierlich und rasch, während die DNS-Synthese der uninfizierten Zelle mit zeitlichen Intervallen verläuft.

Darüber hinaus können die halogenierten Basenanaloge oder deren phosphorylierte Derivate stabile Komplexe mit einem oder mehreren Enzymen der viralen DNS-Synthese eingehen. Das 5-Fluor-2'-Desoxyuridin z.B. ist als Enzym-Inhibitor bekannt. Es besitzt eine hemmende Wirkung auf die Thymidylsäuresynthetase, indem es mit ihr eine irreversible Verbin-

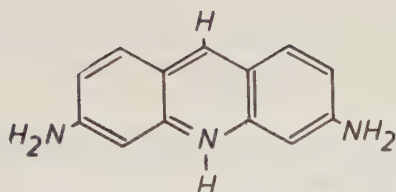
dung eingeht und die Enzymaktivität ausschaltet, so daß kein Thymidinmonophosphat gebildet werden kann (Cohen et al., 1958; Heidelberger, 1961). Das 5-Fluor-2'-Desoxyuridin zeigt wenig Selektivität für den Vermehrungsprozeß der DNS-Viren.

Die oben beschriebenen Eigenschaften der halogenierten Basenanalogue werden bei der lokalen Therapie des Herpes corneae des Menschen, einer ernsthaften Erkrankung des Auges, die zum Erblinden führen kann, mit 5-Jod-2'-Desoxyuridin genutzt (Kaufmann, 1963a,b).

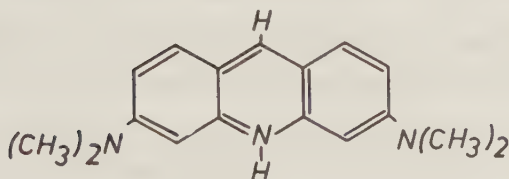
In der vorliegenden Arbeit wird versucht, Aufschluß über die Möglichkeit eines Einbaus von Basenanalogen der RNS in die RNS von animalen RNS-Viren während der Virusvermehrung zu bekommen. Als Modell dient das Virus der Klassischen Geflügelpest (KP-Virus).

2. Einfluß der Acridinfarbstoffe auf die Virusvermehrung

Die Acridinfarbstoffe sind photosensible, heterocyclische, basische Verbindungen. Zwei Vertreter dieser Stoffgruppe sind: Proflavin (3,6-Diaminoacridin) und Acridinorange (3,6-Bis-dimethylaminoacridin). Sie haben folgende Strukturformel:



Proflavin



Acridinorange

Die photodynamische Wirkung der Acridine ist seit der Jahrhundertwende bekannt (Raab, 1900). Raab fand bei Versuchen mit *Paramecium* in Anwesenheit von Acridinorange (AO), daß *Paramecium* unter der Einwirkung des Farbstoffs in der Dunkelheit leben kann, daß es aber stirbt, sobald man die mit dem Farbstoff behandelte Kultur dem Tageslicht aussetzt. Diese Wirkung entfalten die Acridine auch auf lebende Zellen in Gewebekultur, auf Bakterien und Viren.

Die Acridinfarbstoffe besitzen eine starke Affinität zur Nucleinsäure (Scholtissek u. Rott, 1964; Lerman, 1961). Sie werden daher auch zur Vitalfärbung des Kerns benutzt.

Wenn man DNS mit Acridinderivaten behandelt, unterscheidet sich der DNS-Farbstoffkomplex von der nativen DNS in mehreren physikalischen Eigenschaften (Lerman, 1963):

1. Die Länge des Moleküls nimmt im Verhältnis der gebundenen Menge Acridin zu.
2. Die Masse pro Längeneinheit ist vermindert.
3. Die Knäuelung des DNS-Moleküls ist weniger kompakt, da es an Flexibilität eingebüßt hat.
4. Die regelmäßige helikale Struktur geht verloren.

Die 3,4 Å Zwischenräume entlang der Helix bleiben bestehen.

Aus diesen physikalischen Befunden kann geschlossen werden, daß die Bindung des Farbstoffs an die DNS durch elektrostatische und van der Waal'sche Kräfte, die bei der ebenen Konfiguration des Farbstoffs relativ groß sind, zustandekommt. Offenbar schieben sich die Acridinmoleküle zwischen benachbarte Nucleotidpaare, indem sie das Desoxyribosephosphatrückgrat ausdehnen und aufwinden. Dieser Prozeß wird Intercalation genannt. Anscheinend finden die Acridine durch den Einbau in die DNS-Doppelhelix zwischen den Basenpaaren genug Platz, denn die Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleotiden werden nicht gelöst (Lerman, 1963).

Durch die Intercalation entfalten die Acridine eine mutagene Wirkung (Freese, 1959; Orgel u. Brenner, 1961), deren Ursachen in einer sterischen Interferenz während der Nucleinsäure-replikation gesehen wird. Aus verschiedenen Gründen kann ge-

geschlossen werden, daß bei der Vermehrung der Nucleinsäure unter Acridinorangeeinwirkung Insertions- und Deletionsmutanten erzeugt werden, d.h. es werden einzelne Nucleotide hinzugefügt oder ausgelassen (Bresch, 1965c).

Gegenüber der photodynamischen Wirkung verhalten sich die einzelnen Virusgruppen verschieden. So ist bekannt, daß die zu den Enteroviren gehörenden Poliomyelitis- und Coxsackieviren durch Proflavin im extrazellulären System nicht photodynamisch inaktiviert werden können. Es bestehen offenbar Unterschiede in den Permeabilitätsverhältnissen bei den einzelnen Virusgruppen, die ein Eindringen des Farbstoffs durch die Hülle bis zur empfindlichen Stelle, der Nucleinsäure, nicht zulassen. Eine photodynamische Wirkung auf die beiden Enteroviren während der intrazellulären Vermehrung ist möglich (Schaffer, 1962).

Von den von uns untersuchten Myxoviren, dem Virus der Klassischen Geflügelpest (KP-Virus) und dem Newcastle disease Virus (NDV), ist bekannt, daß sie sowohl im extra- wie im intrazellulären System durch Proflavin inaktiviert werden (Scholtissek u. Rott, 1964).

Scholtissek und Becht (1966) beschreiben eine deutliche Hemmung der Penetration von markierten Aminosäuren und Nucleinsäurevorläufern durch die Zellmembran durch Acridinorange.

Daher soll in dieser Arbeit unter weitestgehender Ausschaltung des Lichteinflusses der hemmende Effekt der beiden Acridin-

dinfarbstoffe und der Membraneffekt des Acridinoranges auf die Vermehrung des KP- und Newcastle disease Virus untersucht werden.

3. Affinität von Acridinorange zu Lysosomen

Neben der grünen Fluoreszenz des Zellchromatins erscheint in mit Acridinorange behandelten lebenden Zellen im Cytoplasma eine bestimmte Menge Granula mit einer roten Fluoreszenz. Man vermutete zuerst, daß die gefärbte Granula (red cytoplasmic granules, RCG) einen Komplex zwischen cytoplasmatischer RNS und Farbstoff darstellt (Bertalauffy u. Bickis, 1956; Venetta u. Shure, 1961). Heute weiß man aus elektronoptischen Untersuchungen, daß die RCG eine für Lysosomen und verwandte Partikel typische Ultrastruktur haben. Es konnte nachgewiesen werden, daß die RCG mit den saure Phosphatase enthaltenden multivesiculären Körperchen (MVB) identisch sind (Robbins et al., 1964). Zelenin (1966) zeigte, daß in diesen lysosomale Enzyme enthaltenden Zellstrukturen das Acridinorange akkumuliert.

Die Lysosomen sind intrazelluläre Speicher verschiedener Verdauungsenzyme in konzentrierter Form, die in der normalen Zelle infolge räumlicher Trennung von ihren Substraten inaktiv sind. Bei den Enzymen handelt es sich um Hydrolasen, die Protein, Nucleinsäure und Polysaccharide abbauen. Wird die Lipid-Protein-Doppelmembran der Lysosomen infolge des Zelltods durch die Wirkung gewisser Pharmaka oder durch

Einflüsse anderer zellfremder Stoffe durchlässig, so werden die lysosomalen Enzyme freigesetzt und katalysieren den Abbau zelleigener Substanzen.

Photosensible Substanzen, wie Acridinorange, gelangen in das Innere der Lysosomen, ohne ihnen zu schaden, wenn die Zellen mit dem Stoff im Dunkeln inkubiert werden. Die lysosomalen Enzyme werden erst freigesetzt, wenn die photodynamische Wirkung des Farbstoffs unter dem Einfluß des Lichts einsetzt und die Lysosomenmembran permeabel wird (Allison et al., 1966). Jetzt sind die Substrate den Enzymen zugänglich. Mit einer entsprechenden Enzym-Substrat-Färbung ist je ein spezifisches Enzym nachweisbar (Koenig, 1963).

Manche Autoren vermuten, daß bei der Virusvermehrung in der Zelle während der Eclipse lysosomale Enzyme zum "uncoating", d.h. enzymatischen Abbau des Virushüllproteins, freigesetzt werden. So erbrachte Kowacs (zitiert nach Gajdos, 1966) experimentelle Hinweise, daß 3 - 4 Stunden nach der Infektion von HeLa-Zellen mit Poliovirus die lysosomalen Enzyme Ribonuclease und saure Phosphatase aktiviert waren, daß die nicht-lysosomale Glucose-6-Phosphatase jedoch nur eine schwache Aktivität aufwies. Allison und Sandelin (1963) fanden in mit Mäuse-Hepatitisvirus-infizierten Mäuseleberzellen und in mit Vacciniavirus-infizierten Affennierenzellen eine gegenüber uninfizierten Zellen gesteigerte Aktivität mehrerer lysosomaler Enzyme. Die Autoren nehmen an, daß die Freisetzung lysosomaler Enzyme bestimmte der in infizierten Zellen gefundenen, biochemischen Veränderungen erklären und zum

cytopathogenen Effekt mancher Viren beitragen könnte (Wolf, 1964).

An einer Versuchsreihe sollte daher festgestellt werden, ob das Acridinorange eventuell durch die Blockierung der lysosomalen Enzyme mit einem Prozeß während der "Uncoating-Phase" interferieren könnte.

II. Die Myxoviren

Der Erreger der Klassischen Geflügelpest und der Newcastle disease gehören beide zur Gruppe der Myxoviren (Andrews et al., 1955). Die Myxoviren sind komplex aufgebaute, lipidhaltige RNS-Viren (Rott, 1965) mit einem Durchmesser von 80 - 200 m μ und einer sphärischen, fadenförmigen oder pleomorphen Gestalt. Sie enthalten in ihrem Innern eine filamentöse Komponente, die aus Ribonucleinsäure und Protein besteht, das Ribonucleoproteid (RNP)-Antigen. In seiner Feinstruktur erinnert das RNP-Antigen des NDV an das Tabakmosaikvirus, d.h. die Proteinuntereinheiten sind schraubenförmig um einen zentralen Hohlkanal angeordnet. Beim RNP-Antigen des KP-Virus dagegen scheinen die Proteinuntereinheiten in Form einer locker gewundenen Doppelhelix vorzuliegen. Das RNP-Antigen ist der eigentliche Träger des genetischen Materials des Viruspartikels. Es ist im isolierten Zustand nicht infektiös und läßt sich nur mit Hilfe von serologischen Methoden als virusspezifisch erfassen. Durch Ätherbehandlung des Virions läßt sich das RNP-Antigen von einer

mit zylindrisch erscheinenden Projektionen besetzten Außenhülle abtrennen. Diese Außenhülle besteht chemisch aus Protein, Lipid und Kohlenhydrat. Auf ihr sind die hämagglutinierende, die immunogene, die toxische und die Neuraminidase-Aktivität des Viruspartikels lokalisiert (Rott, 1962, 1964). Auf Grund morphologischer und biologischer Unterschiede lassen sich die Myxoviren in zwei Untergruppen aufteilen, nämlich in die Influenza- und die Parainfluenzaviren. Das KP-Virus gehört der Influenza-, das NDV der Parainfluenza-Untergruppe an. Während beim KP-Virus das RNP-Antigen im Kern und das Hämagglutinin im Cytoplasma synthetisiert werden, findet beim NDV die Synthese beider Komponenten im Cytoplasma der Zelle statt (Breitenfeld u. Schäfer, 1957; Reda et al., 1964).

III. Chemotherapeutische Beeinflussung von Myxovirus-Infektionen

1-Adamantanamin, ein synthetisches Amin, inhibiert die Vermehrung verschiedener Myxoviren. Vier Influenza A-Stämme (1 A1- und 3 A2-Stämme), ein Influenza C-Stamm und ein Parainfluenza 1-Stamm (Sendai) wurden als empfindlich beschrieben (Davies et al., 1964). Beim Rubellavirus, das einige charakteristische Eigenschaften der Myxoviren besitzt, konnte auch eine Empfindlichkeit festgestellt werden (Maassab u. Cochran, 1964). Viele der bekannten Myxoviren, wie die Viren der Influenza B-Stämme, das KP-Virus, das NDV, das Mumpsvirus und die Parainfluenza 1-, 2-, und 3-Viren, sind resistent

gegen die Verbindung (Davies et al., 1964; Rott u. Scholtissek, persönliche Mitteilung).

1-Adamantanamin ist in virushemmenden Konzentrationen für die Zelle offenbar nicht toxisch. Nach den heutigen Ergebnissen scheint es klar, daß es zu einem frühen Zeitpunkt der Virus-Zellbeziehung eingreift. Man nimmt an, daß 1-Adamantanamin die Penetration blockiert oder verlangsamt (Tamm u. Eggers, 1965).

Die therapeutische Wirkung wurde an Mäusen, die mit Influenza A2-Virus infiziert waren, gezeigt. Die Tiere wurden 72 Stunden nach der Infektion behandelt. Die Überlebensrate stieg an und die Überlebenszeit war länger. Die Krankheit wurde nicht ganz unterdrückt, aber stark gemildert (Tamm u. Eggers, 1965). Bei experimentell mit Influenzavirus A2 equi infizierten Pferden konnte durch vorausgehende Behandlung mit 1-Adamantanaminhydrochlorid ein prophylaktischer Effekt erzielt werden. Die Krankheitserscheinungen waren bei den vorbehandelten Tieren weniger deutlich ausgeprägt wie bei den Kontrolltieren (Bryans et al., 1966). Ebenso wurde beim Menschen mit Freiwilligen in prophylaktischen und therapeutischen Versuchen die antivirale Wirkung des 1-Adamantanamins gegenüber Influenza A2-Virus studiert. Bei Praemedikation der Freiwilligen war der Grad der Antikörperbildung und das Ausmaß der klinischen Erkrankung deutlich herabgesetzt. Bei therapeutischer Verabfolgung des Stoffes vier Stunden p.i. konnte keine gegen das Virus gerichtete Wirksamkeit gefunden werden

IV. Material und Methoden

1. Virus

Für die Untersuchungen wurden der KP-Virusstamm "Rostock" und der NDV-Stamm "Italien", die in Hühnereipassagen fortgeführt werden, verwendet.

Als Standardvirus diente frisch gewonnene Allantoisflüssigkeit von embryonierten Hühnereiern, die am 12. (KP-Virus) bzw. 11. (NDV) Bebrütungstag mit $10^1 - 10^2$ plaquebildenden Einheiten des entsprechenden Virus in die Allantoishöhle infiziert worden waren.

Für Adsorptionsversuche wurde das KP-Virus einmal in Minimalmedium über Fibroblastenkultur passagiert. Nach Adsorption mit einer 1 : 1000 verdünnten Allantoisflüssigkeit von 2^8 HA-Einheiten wurde die Kultur über Nacht bebrütet.

2. Zu untersuchende chemische Stoffe

a) Basenanaloge

4,6-Diamino-2-hydroxy-pyrimidin

4,6-Diamino-2-mercapto-pyrimidin

4,6-Diaminopyrimidin x HCl

Adenosin-N₁-Oxyd

6-Mercaptopurin

5-Hydroxyuridin

Alle 6 Stoffe waren ein Geschenk der Zellstoff-Fabrik Waldhof. Die Basenanaloge wurden jeweils 500 μ /ml in Minimalmedium gelöst und steril filtriert. Die Stammlösung wurde dann zu Konzentrationen von 100 μ /ml, 10 μ /ml und 1 μ /ml verdünnt.

b) Acridinfarbstoffe

Acridinorange wurde von der Firma Riedel-de Haen, Seelze-Hannover bezogen und nach dem von Scholtissek und Becht (1966) beschriebenen Verfahren durch Chromatographie an Aluminiumoxyd gereinigt. Die Substanz wurde im Dunkeln aufbewahrt. 1 mg Acridinorange wurde mit 0,1 ml $\frac{n}{10}$ HCl ad 10 ml sterilem bidestilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde in einem Glasgefäß bewahrt, das keinen Lichtzutritt gestattete.

Proflavin war ein Geschenk der Farbenfabriken Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld. Es wurde ebenso behandelt und gelöst wie das Acridinorange.

c) Ein_Pyrimidinabkömmling

"Persantin", 2,6-Bis (diaethanolamino)-4,8-dipiperidinopyrimido (5,4-d) pyrimidin, ist ein Herzpräparat, das uns die Firma Dr. Karl Thomae GmbH in Biberach an der Riss zur Verfügung stellte. Das Präparat wurde in dem mitgelieferten Citratpuffer 1 : 1 verdünnt. Mit Minimalmedium wurde eine

Stammlösung hergestellt, die 50 μ /ml enthielt, die dann weiter verdünnt wurde.

3. Gewebekultur

a) Medium und Lösungen

Wachstumsmedium

Als Wachstumsmedium wurde ein Lactalbumin-, Hefe- und Vitamin-B-haltiges Medium (Lavit) mit einem Zusatz von 10 % Kälberserum verwendet.

Minimalmedium

Als Minimalmedium wurde Earles Salzlösung (ES), die 5 mMol Glucose und 2 mMol Glutamin enthielt, verwendet.

NaCl-Phosphatpuffer, pH 7,2

Zum Verdünnen und Aufarbeiten des infektiösen Materials wurde eine isotonische Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2, gebraucht.

Hanks-Lösung

Zum Waschen der Zellkulturen wurde die Salzlösung nach Hanks, die neben Glucose noch Ca- und Mg-Ionen enthält, verwendet.

b) Embryonale Hühnerzellen

Hühnerfibroblasten wurden im Prinzip nach der von Kraus und Schäfer (1963) beschriebenen Methode hergestellt. Nach Aufnahme der Fibroblasten in Wachstumsmedium wurde eine Zellzahl von 2×10^6 /ml eingestellt und Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm mit der Suspension beschickt. Die Kulturen konnten, nachdem sie 24 Stunden bei 37° C unter Zufuhr von CO_2 inkubiert worden waren, infiziert werden.

Zum Anzüchten von Virus in Minimalmedium wurden Petrischalen mit 9 cm Durchmesser verwendet.

Zum Plaquetest wurden Petrischalen (5 cm Ø) mit der halben Zellzahl (1×10^6 /ml) beschickt, nach 24 Stunden das Wachstumsmedium durch Lavit ohne Serumzusatz ersetzt und die Kultur ein oder zwei Tage später verwendet.

c) Deckglaskulturen

Für mikroskopische Untersuchungen wurden Sekundärkulturen von Hühnerfibroblasten verwendet. Petrischalen mit 5 cm Durchmesser wurden mit etwa 100 000 Primärfibroblasten eingesät und 24 Stunden mit Wachstumsmedium bebrütet. Dann wurde über Nacht mit Lavit ohne Serumzusatz weiterbebrütet und die Kulturen am nächsten Tag verwendet.

d) HeLa-Zellen

Ein im Institut permanent weitergeführter HeLa-Zellstamm wurde verwendet. Die Zellen wurden in Petrischalen mit 5 cm Durch-

messer so ausgesät, daß die Schale nach 2 Tagen etwa 5×10^6 Zellen enthielt.

4. Biologische Untersuchungsmethoden

a) Plaque-Test

Zur Bestimmung der Infektiosität wurde der von Dulbecco (1952) entwickelte Plaque-Test auf Gewebekulturen embryonaler Hühnerzellen verwendet. Die Anzahl der plaquebildenden Einheiten (PBE) wurde jeweils auf 1 ml bezogen.

b) Hämagglutinationsreaktion (HA-Reaktion)

Zur Bestimmung des Hämagglutinationstiters wurde die vom Committee on Standard Serological Procedures in Influenza Studies (1950) empfohlene Methode benutzt. Die Reaktion wurde nach 45 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur für KP-Virus und bei 4°C für NDV abgelesen.

c) Komplementbindungsreaktion (KBR)

Wir verwendeten die von Hennessen (1955) angegebene Modifikation der von Fulton und Dumbell (1949) beschriebenen Mikromethode mit einer abgestuften Komplementverdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 1,3). Der Titer wird als Vielfaches des Komplementverbrauchs (Q) angegeben.

d) Seren

Antiserum gegen Influenza A1 FM1

Das Antiserum stammte von Mäusen, die mit dem Influenza A1-Stamm FM1 infiziert worden waren. Von den Untereinheiten des KP-Virus reagiert mit diesem Antiserum nur das RNP-Antigen, nicht aber das Oberflächen-Antigen oder Hämagglutinin (Schäfer, 1955).

Anti-NDV-Serum

Das Antiserum stammte von Ratten, die mit 0,3 ml NDV-Konzentrat, Stamm "Italien", mit einem Hämagglutinationstiter von 2^{-10} durch intracerebrale Injektion infiziert worden waren. Das Serum wurde 10 Tage nach der Injektion entnommen.

Anti-Hammelerythrozyten-Serum

Als Anti-Hammelerythrozyten-Serum verwendeten wir den Hämolytischen Ambozeptor der Behringwerke AG, Marburg.

5. Dosiseffekt

Zu den Versuchen wurden einen Tag alte Gewebekulturen mit ca. 5×10^6 Zellen in Petrischalen von 5 cm Durchmesser verwendet. Nach Absaugen des Wachstumsmediums wurde der Zellrasen einmal mit NaCl-Phosphatpuffer gewaschen und mit 1 ml infektiöser Allantoisflüssigkeit (2^7 HA-Einheiten), eine ausreichende Konzentration, um nahezu sämtliche Zellen annähernd gleichzeitig zu infizieren, beimpft. Nach einer Adsorptions-

zeit von 30 Minuten bei 37° C wurde das infektiöse Material von der Zellkultur abgesaugt und der Zellrasen dreimal mit NaCl-Phosphatpuffer gewaschen. Zwei der gewaschenen Petrischalen wurden zur Kontrolle der adsorbierten Virusmenge aus dem Versuch genommen und bis zur Aufarbeitung in der Kühltruhe bei -20° C aufbewahrt. Anschließend wurden die dreimal gewaschenen Kulturen mit 2 ml Minimalmedium (MM), das den zu untersuchenden Stoff in fallenden Verdünnungen enthielt, überschichtet. Für jede Verdünnung wurden 2 Schalen parallel geführt. Zur Kontrolle wurden 2 Kulturen nur mit MM belegt.

Das Ende der Adsorptionszeit wurde als Zeit 0 nach der Infektion (p.i.) betrachtet. Die mit KP-Virus infizierten Zellkulturen wurden 8 Stunden lang, die mit NDV infizierten 10 Stunden lang p.i. bei 37° C inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und bis zur weiteren Untersuchung bei 4° C aufbewahrt. Der Zellrasen wurde dreimal mit NaCl-Phosphatpuffer gewaschen und bis zur Aufarbeitung bei -20° C aufbewahrt.

Die Zellen wurden aufgearbeitet, indem sie unter Zugabe von 1,5 ml NaCl-Phosphatpuffer je Schale mechanisch vom Boden der Petrischale gelöst wurden. Die Zellsuspension wurde dreimal bei etwa -30° C eingefroren und bei Zimmertemperatur aufgetaut. Die Zelltrümmer wurden durch 10 Minuten langes Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen pro Minute sedimentiert und verworfen. Der Überstand wurde untersucht.

Es wurden im Medium und in den Zellen die Hämagglutination und die Infektiosität, in den Zellen außerdem die komplement-bindende Aktivität des RNP-Antigens bestimmt.

Bei der Untersuchung des Dosiseffektes von Acridinfarbstoffen wurden die Kulturen bei Rotlicht belegt und in der Dunkelheit inkubiert. Ebenso wurde die Aufarbeitung bei Rotlicht bzw. Dunkelheit durchgeführt. Die Untersuchungsproben wurden bei Rotlicht in zwei Teile getrennt, ein Teil zur Bestimmung der Infektiosität, der in der Dunkelheit gehalten wurde, und ein Teil zur serologischen Untersuchung, der nicht mehr vor dem Tageslicht geschützt zu werden brauchte.

6. Einfluß auf die Adsorptionsphase

Zur Untersuchung der Wirksamkeit der zu prüfenden Stoffe während der Adsorptionsphase wurden die Zellkulturen, nachdem sie einmal mit NaCl-Phosphatpuffer gewaschen waren, mit Verdünnungen der zu untersuchenden Substanz in MM belegt und 15 Minuten lang inkubiert. Daraufhin wurden die Medien abgesaugt und die Zellen mit in MM angezüchtetem Virus infiziert. Nach 30 Minuten Adsorption bei 37° C wurde die infektiöse Eiflüssigkeit abgesaugt, dreimal mit NaCl-Phosphatpuffer gewaschen und die ursprünglichen Verdünnungen des zu untersuchenden Stoffes in Minimalmedium wieder zugefügt. Die weitere Behandlung erfolgte, wie es im Abschnitt "Dosiseffekt" beschrieben wird.

Bei Versuchen mit Acridinfarbstoffen wurden die dort erwähnten Maßnahmen zur Ausschaltung des Tageslichtes eingehalten.

7. Stundenwerte während des Infektionszyklus

Um näheren Aufschluß darüber zu bekommen, welche Phase des Infektionszyklus von einem Stoff beeinflusst wird, wurde der Infektionsablauf zeitlich unterteilt, und die zu untersuchende Substanz zu bestimmten Zeitpunkten des Infektionszyklus dem infizierten System zugesetzt. Um die Wirkung des Inhibitors mit der unbeeinflussten ablaufenden Virusvermehrung vergleichen zu können, werden zu jedem Zeitpunkt Kontrollkulturen, die zur Zeit 0 p.i. mit Medium ohne Zusatz belegt wurden, aus dem Versuch genommen.

Bei Versuchen mit KP-Virus wurde die zu untersuchende Substanz bei 0, 1, 2, 3 und 4 Stunden p.i. bzw. bei 0, 2, 4 und 6 Stunden p.i. zugesetzt und die Kulturen bis 8 Stunden p.i. weiterbebrütet. Zu diesen Zeiten wurden parallel geführte Kontrollkulturen entnommen. Die weitere Behandlung erfolgte, wie es im Abschnitt "Dosisseffekt" beschrieben wird.

Bei Untersuchungen mit NDV waren die entsprechenden Zeitpunkte 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Stunden p.i. und die Inkubationszeit 10 Stunden lang p.i.

8. Das Verhalten der Lysosomen während der Virusvermehrung

Deckglaskulturen mit sekundären Hühnerfibroblasten, die vor Versuchsansatz eine Nacht unter Lavit ohne Serumzusatz gehalten waren, wurden 15 Minuten lang mit 2 ml Acridinorange-verdünnungen von 0, 5, 10 und 20 μ /ml MM je Schale bei 37° C inkubiert. Für jede Verdünnung liefen zwei Deckglaskulturen parallel. Der Versuch wurde unter den schon erwähnten Vorsichtsmaßnahmen zur weitestgehenden Ausschaltung des Lichteinflusses durchgeführt. Nach dem Absaugen der Acridinorange-verdünnungen wurden von den zwei Schalen jedes Verdünnungswertes eine mit 1 ml in MM angezüchtetem KP-Virus (2⁷ HAEinheiten) infiziert, die andere wurde mit 1 ml MM belegt. Nach 30 Minuten langer Adsorption bei 37° C wurde die infektiöse Flüssigkeit bzw. das MM abgesaugt, der Zellrasen dreimal mit Hanks-Lösung gewaschen und die ursprünglichen AO-Verdünnungen (2 ml je Platte) zugesetzt. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37° C wurden die Kulturen dreimal mit Hanks-Lösung gewaschen und unter Hanks-Lösung bei Zimmertemperatur bis zur Färbung der Kulturen nach der Saure-Phosphatase-Methode (basierend auf Gomori, 1956) gefärbt. Die gefärbten Deckglaskulturen wurden mit gepuffertem Glycerin auf Objektträger fixiert und mikroskopisch besichtigt.

9. Lysosomenfärbung

Saure-Phosphatase-Technik

Färbelösung:

0,01 M Natrium- β -glycerophosphat
in 0,05 M Acetatpuffer, pH 5,0, der
0,004 M Bleinitrat enthält.

Die Lösung wird mit physiologischer Kochsalzlösung isotonisch gemacht, über Nacht bei 37° C inkubiert und vor dem Gebrauch filtriert.

Stammlösung:

Natrium- β -glycerophosphat	0,1 M	10,0
Acetatpuffer, pH 5,0	1,0 M	5,0
Bleinitrat	0,1 M	4,0

Die Substrat-Gebrauchslösung wird hergestellt, indem 19 Teile Stammlösung mit physiologischer Kochsalzlösung auf 100 Teile aufgefüllt werden.

Färbeverfahren:

1. Die Deckgläser werden in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen,
2. 10 - 20 Minuten bei 37° C in der Färbelösung inkubiert,
3. 10 Sekunden in eine 1 %ige Essigsäurelösung (V/V) getaucht,
4. 5 Minuten in mit H_2S gesättigtes Wasser gelegt und
5. gut mit destilliertem Wasser gewaschen.

V. Untersuchungsergebnisse

Als Maß für die Inhibition der Virusvermehrung gilt die Bildung infektiöser Viruspartikel und die Synthese virusspezifischer Komponenten: Hämagglutinin (HA) und Ribonucleoprotein-Antigen (RNP-Antigen). In der vorliegenden Arbeit werden die drei virusspezifischen Aktivitäten untersucht: Infektiosität und Hämagglutination vom Medium und Zellextrakt, das RNP-Antigen ausschließlich vom Zellextrakt.

1. Versuche mit Basenanalogen

Wie bereits erwähnt, können Desoxy-Basenanalogue in das genetische Material von DNS-Viren inkorporiert werden. In den folgenden Versuchen soll geklärt werden, ob die 6 Basenanalogue 4,6-Diamino-2hydroxy-pyrimidin, 4,6-Diamino-2-mercapto-pyrimidin, 4,6-Diamino-pyrimidin x HCl, Adenosin-N₁-Oxyd, 6-Mercaptopurin und 5-Hydroxyuridin in die Vermehrung des KP-Virus eingreifen.

Aus den Ergebnissen der Dosiseffektversuche mit den 6 genannten Verbindungen, die in Tabelle 1 bis 6 dargestellt sind, geht hervor, daß die Substanzen in Verdünnungen von 500, 100, 10 und 1 μ /ml Minimalmedium die Vermehrung des KP-Virus in Hühnerfibroblasten nicht signifikant inhibieren, wenn sie zur Zeit 0 p.i. zu den Kulturen zugegeben werden. Sowohl im Medium als auch in den Zellen konnte weder bei den Viruskomponenten noch bei der Infektiosität ein deutlicher Titerabfall 8 Stunden p.i. gefunden werden.

Bei Dosis-effektversuchen über die Wirksamkeit der 6 Basen-analoge auf die Vermehrung des KP-Virus in HeLa-Zellen (Tab. 7), wobei nur die Hämagglutinationsaktivität untersucht wurde, konnte bei dem Adenosin-N₁-Oxyd ein deutlicher, bei dem 4,6-Diaminopyrimidin x HCl und dem 4,6-Diamino-2-mercaptopyrimidin ein weniger deutlicher Abfall des HA gefunden werden. Die übrigen Substanzen zeigten keinen Effekt.

2. Versuche mit dem Pyrimidinabkömmling Persantin

Im Dosis-effektversuch mit Persantin in Dosen von 50, 10, 5, 2 und 1 μ /ml MM auf das Wachstum von KP-Virus in Hühner-fibroblasten konnte keine Wirksamkeit festgestellt werden (Tab. 8).

Bei der Untersuchung des Persantins während der Adsorp-tionsphase wurde kein signifikanter Titerabfall der drei Parameter bei der Vermehrung des KP-Virus in Hühnerfibro-blasten gefunden (Tab. 9).

3. Versuche mit Acridinfarbstoffen

a) Wirkung des Acridinoranges auf die Vermehrung des KP-Virus

Im Dosis-effektversuch mit Acridinorange auf mit KP-Virus-infizierten Hühnerfibroblastenkulturen fällt im Medium von einer Acridinorangekonzentration von 0 - 45 μ /ml MM der

Tabelle 1

Dosiseffekt von 4,6-Diamino-2-hydroxy-pyrimidin auf die Vermehrung des KP-Virus
in Hühnerfibroblasten

Dosis in γ pro ml MM	Medium			Zellen		
	HAE	PBE/ml	HAE	RNP-Antigen KBR-E. (Q)	PBE/ml	
500	32	$4,25 \times 10^7$	64	2,5	$6,00 \times 10^7$	
100	64	$5,00 \times 10^7$	128	2,5	$9,00 \times 10^7$	
10	64	$4,75 \times 10^7$	128	2,5	$1,00 \times 10^8$	
1	64	$4,25 \times 10^7$	128	2,5	$1,05 \times 10^8$	
0	64	$3,25 \times 10^7$	128	2,5	$5,00 \times 10^7$	
Kontrolle zur Zeit 0 p.i.			0	1,0	$2,50 \times 10^5$	

Tabelle 2

Dosiseffekt von 4,6-Diamino-2-mercapto-pyrimidin auf die Vermehrung des KP-Virus
in Hühnerfibroblasten

Dosis in μ pro ml MM	Medium		Zellen	
	HAE	PBE/ml	HAE	RNP-Antigen KBR-E. (Q)
500	64	$3,00 \times 10^7$	128	3,7
100	64	$4,70 \times 10^7$	128	3,7
10	64	$3,90 \times 10^7$	128	3,7
1	64	$3,40 \times 10^7$	128	3,7
0	64	$2,75 \times 10^7$	128	3,7
Kontrolle zur Zeit 0 p.i.			0	1,14
				$5,00 \times 10^4$

Tabelle 3

Dosiseffekt von 4,6-Diamino-pyrimidin x HCl auf die Vermehrung des KP-Virus
in Hühnerfibroblasten

Dosis in μ pro ml MM	Medium		Zellen	
	HAE	PBE/ml	HAE	RNP-Antigen KBR-E. (Q)
500	64	$1,50 \times 10^7$	512	4,2
100	64	$2,75 \times 10^7$	512	3,7
10	64	$3,00 \times 10^7$	512	3,7
1	64	$2,75 \times 10^7$	512	3,7
0	64	$2,25 \times 10^7$	512	3,7
Kontrolle zur Zeit 0 p.i.			0	1
				$7,50 \times 10^5$

Tabelle 4

Dosiseffekt von Adenosin-N₁-Oxyd auf die Vermehrung von KP-Virus in Hühner-fibroblasten

Dosis in μ pro ml MM	Medium		Zellen	
	HAE	PBE/ml	HAE	RNP-Antigen KBR-E. (Q)
500	32	$1,35 \times 10^7$	256	3,7
100	64	$2,60 \times 10^7$	512	4,2
10	64	$2,40 \times 10^7$	512	4,2
1	64	$3,50 \times 10^7$	512	4,2
0	64	$2,55 \times 10^7$	512	4,2
Kontrolle zur Zeit 0 p.i.			0	1,0
				$7,50 \times 10^5$

Tabelle 5

Dosisseffekt von 6-Mercaptopurin auf die Vermehrung des KP-Virus in Hühner-
fibroblasten

Dosis in μ pro ml MM	Medium		Zellen	
	HAE	PBE/ml	HAE	RNP-Antigen KBR-E. (Q)
500	32	$2,15 \times 10^7$	128	3,7
100	64	$4,75 \times 10^7$	256	3,7
10	64	$6,80 \times 10^7$	256	3,3
1	64	$6,55 \times 10^7$	256	3,3
0	64	$6,85 \times 10^7$	256	3,7
Kontrolle zur Zeit 0 p.i.			0	1
				$4,50 \times 10^5$

Tabelle 6

Dosiseffekt von 5-Hydroxyuridin auf die Vermehrung des KP-Virus in Hühner-fibroblasten

Dosis in γ pro ml MM	Medium		Zellen	
	HAE	PBE/ml	HAE	RNP-Antigen KBR-E. (Q)
500	64	$1,60 \times 10^7$	128	3,7
100	64	$2,20 \times 10^7$	128	4,2
10	64	$2,50 \times 10^7$	128	3,7
1	64	$2,25 \times 10^7$	128	3,7
0	64	$2,83 \times 10^7$	128	3,7
Kontrolle zur Zeit 0 p.i.			0	1
				$3,00 \times 10^5$

Tabelle 7

Dosiseffekt von 6 Basenanaloga auf die Bildung des Hämagglutinins von KP-Virus in Hela-Zellen

Dosis in μ M pro ml MM	4,6-Diamino-2-hydroxy-pyrimidin		4,6-Diamino-2-mercaptopyrimidin		4,6-Diamino-pyrimidin x HCl		Adenosin-N ₁ -Oxyd		6-Mercaptopurin		5-Hydroxyuridin	
	Medium	Zellen	Medium	Zellen	Medium	Zellen	Medium	Zellen	Medium	Zellen	Medium	Zellen
500	8	128	2	16	2	0	4	0	4	128	8	16
100	8	128	2	64	2	64	4	0	4	128	8	128
10	8	128	4	128	4	128	4	64	4	128	8	128
1	8	128	4	128	4	128	8	128	4	128	8	128
0	8	128	4	128	4	128	8	128	4	128	8	128
Kontrolle zur Zeit 0 p.i.		0		0		0		0		0		0

Tabelle 8

Dosiseffekt von Persantin auf die Vermehrung des KP-Virus in Hühnerfibroblasten

Dosis in γ pro ml MM	Medium		Zellen		
	HAE	PBE/ml	HAE	RNP-Antigen KBR-E. (O)	PBE/ml
50	32	$7,00 \times 10^6$	64	3,7	$1,70 \times 10^7$
10	64	$1,25 \times 10^7$	64	3,7	$2,15 \times 10^7$
5	64	$8,00 \times 10^6$	128	3,7	$3,40 \times 10^7$
2	64	$1,15 \times 10^7$	128	3,7	$3,75 \times 10^7$
1	64	$7,50 \times 10^6$	128	3,7	$2,75 \times 10^7$
0	64	$1,75 \times 10^7$	128	3,7	$2,05 \times 10^7$
Kontrolle zur Zeit 0 p.i.			0	1	$1,00 \times 10^4$

Tabelle 9

Dosiseffekt von Persantin auf die Adsorption des KP-Virus an H nnerfibroblasten

Dosis in μ pro ml MM	Medium		Zellen		
	HAE	PBE/ml	HAE	RNP-Antigen KBR-E. (Q)	PBE/ml
30	64	$2,15 \times 10^7$	64	3,70	$8,00 \times 10^5$
15	64	$1,30 \times 10^7$	64	3,70	$1,25 \times 10^6$
5	64	$1,55 \times 10^7$	64	3,70	$2,60 \times 10^6$
1	64	$1,70 \times 10^7$	128	3,70	$1,40 \times 10^6$
0	128	$2,00 \times 10^7$	256	3,70	$4,05 \times 10^6$
Kontrolle zur Zeit 0 p.i.			0	1,14	$2,50 \times 10^4$

Hämagglutinationstiter von 48 auf 0 HAE (= 100 %), und der Infektiositätstiter von $9,00 \times 10^6$ auf $5,20 \times 10^4$ PBE/ml (= 99,42 %) ab. Im Zellextrakt ist der Abfall der Hämagglutination und der Infektiosität etwa gleich (Abb. 2). Die komplementbindende Aktivität des RNP-Antigens erfährt keinen Abfall (Abb. 3). Das Absinken der HA- und Infektiositätsaktivität ist von der Dosis des AO abhängig.

Im Adsorptionsversuch ist der Abfall des HA- und Infektiositätstiters steiler als im Dosiseffektversuch. Die zellfreie HA-Aktivität ist bei 25 μ AO/ml MM und die zellgebundene bei 30 μ AO/ml MM verschwunden. Die Anzahl der plaquebildenden Einheiten nimmt im Medium und in den Zellen zwischen einer Acridinorangedkonzentration von 0 - 40 μ /ml MM um vier Zehnerpotenzen ab. Der KBR-Titer des RNP-Antigens bleibt von 0 - 20 μ AO/ml MM konstant und fällt dann über einen mittleren Wert bei 25 μ AO/ml MM bei 30 μ AO/ml auf 0 ab (Abb. 4 u. 5).

Im Stundenversuch mit zwei Verdünnungen, 25 μ AO/ml MM und 40 μ AO/ml MM, konnte gezeigt werden, daß bei einer Inkubation von 0 - 8 Stunden p.i. und 2 - 8 Stunden p.i. mit 40 μ AO/ml MM die Bildung des zellfreien Hämagglutinins vollständig, mit 25 μ AO/ml MM bis auf 2 bzw. 6 HA-Einheiten gegenüber 48 Einheiten in der Kontrolle gehemmt werden kann. Die Produktion des zellgebundenen Hämagglutinins sinkt unter der höheren AO-Verdünnung bei einer Zugabe zur Zeit 0 p.i. von 256 HAE in der Kontrolle auf 48 HAE ab. Bei Zugabe von 25 μ AO/ml MM zur Zeit 2 Stunden p.i. werden 112 HAE gebil-

Abb. 2 Dosisseffekt von Acridinorange auf die Vermehrung des KP-Virus in Hühnerfibroblasten; zellfreies HA ▲-▲ , zellgebundenes HA ▲-▲ , zellfreie Infektiosität ●-● , zellgebundene Infektiosität ○-○ .

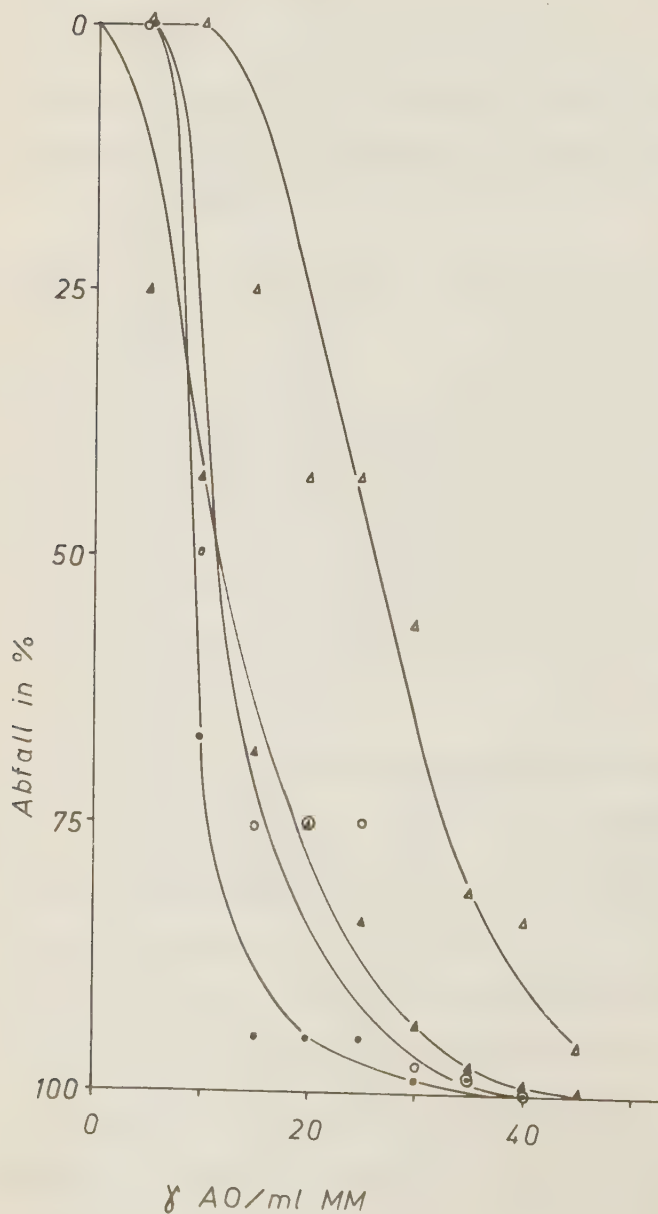


Abb. 3 Dosisseffekt von Acridinorange auf die Synthese des RNP-Antigens des KP-Virus in Hühnerfibroblasten.

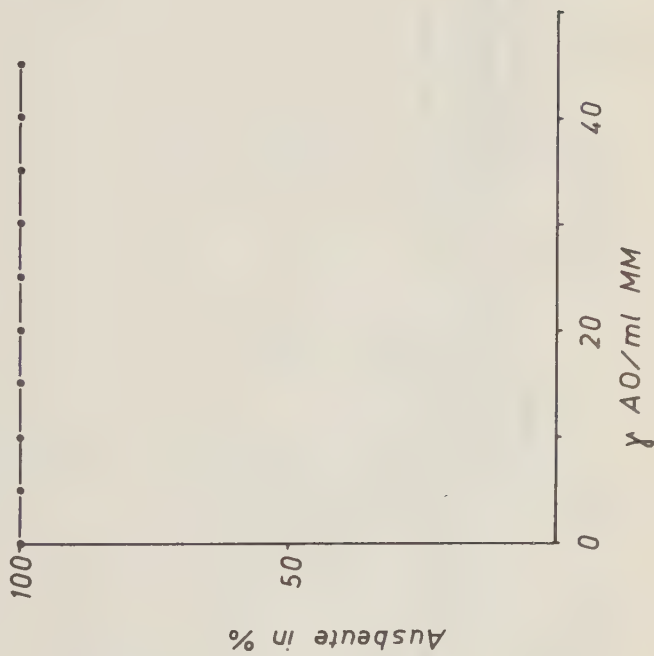


Abb. 4 Dosisseffekt von Acridinorange auf die Vermehrung des KP-Virus in Hühnerfibroblasten, Acridinorangezugabe 15 Minuten vor der Infektion; zellfreies HA ▲-▲ , zellgebundenes HA ▲-▲ , zellfreie Infektiosität ●-● , zellgebundene Infektiosität ○-○ .

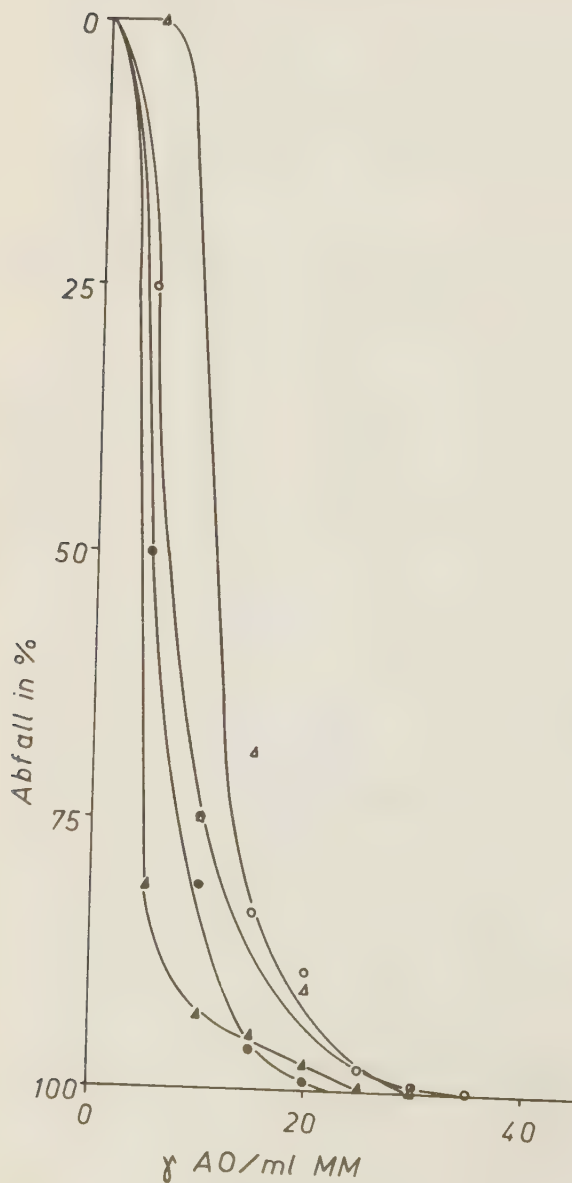
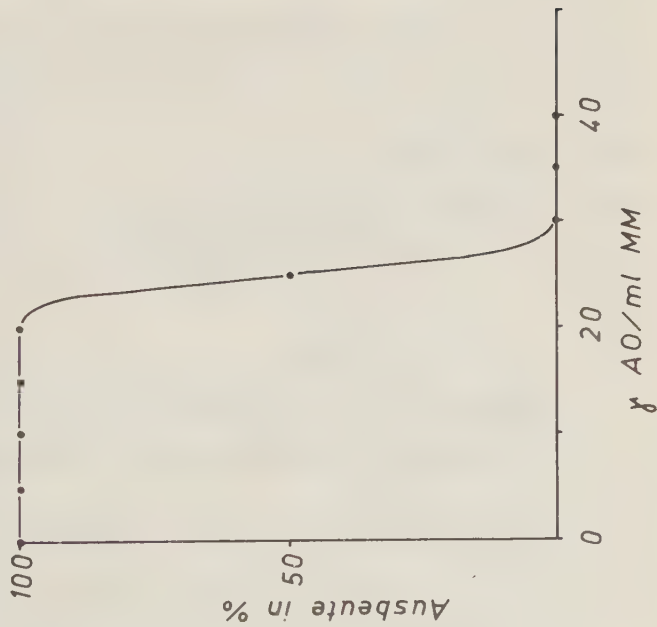


Abb. 5 Dosisseffekt von Acridinorange auf die Synthese des RNP-Antigens von KP-Virus in Hühnerfibroblasten, Acridinorangezugabe 15 Minuten vor der Infektion.



det. Unter der geringeren AO-Verdünnung sinkt der HA-Titer von 256 HAE auf 6 HAE bei Zugabe des Farbstoffs zur Zeit 0 und 2 Stunden p.i. Die Infektiosität sinkt unter einem 8-Stundenblock mit 25 μ AO/ml MM im Medium und im Zellextrakt um etwa zwei Zehnerpotenzen, mit 40 μ AO/ml MM um etwa drei Zehnerpotenzen. Bei Zugabe des Inhibitors zu 4 und 6 Stunden p.i. kann in der zellfreien und zellgebundenen HA- und Infektiositätsaktivität kein deutlicher Abfall mehr festgestellt werden. Der Titer des RNP-Antigens konnte mit den beiden Verdünnungen bei Zugabe zur Zeit 0, 2, 4 und 6 Stunden p.i. nicht signifikant gesenkt werden (Abb. 6, 7, 8, 9 u. 10).

b) Ergebnisse der Untersuchung der lysosomalen Enzyme während der Virusvermehrung unter Acridinorange

Es wurde in den uninfizierten und mit Acridinorange unbehandelt gebliebenen Kontrollkulturen genauso wie in den nur mit AO-inkubierten und in den AO-inkubierten, infizierten Zellkulturen mikroskopisch eine quantitativ gleiche Färbung der lysosomalen Enzyme gefunden. Ein Unterschied gegenüber den Kontrollen konnte nicht festgestellt werden.

4. Wirkung des Proflavins auf die Vermehrung des KP-Virus

Im Dosiseffektversuch mit verschiedenen Mengen Proflavin, die mit KP-Virus-infizierten Hühnerfibroblastenkulturen zur

Abb. 6 Einfluß von 25 und 40 μ Acridinorange/ml MM auf die Synthese des zellfreien HA des KP-Virus in Hühnerfibroblasten.

 40 μ AO/ml MM,
  25 μ AO/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der AO-Zugabe.

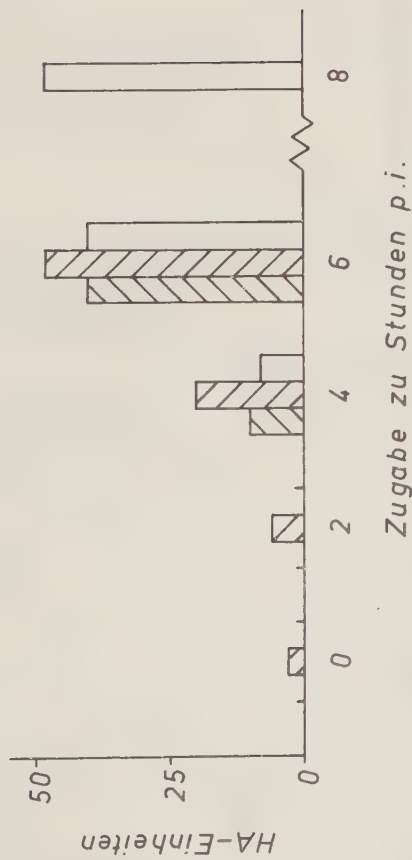


Abb. 7 Einfluß von 25 und 40 γ Acridinorange/ml MM auf die Synthese des zellgebundenen HA des KP-Virus in Hühnerfibroblasten.

 40 γ AO/ml MM,
  25 γ AO/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der AO-Zugabe.

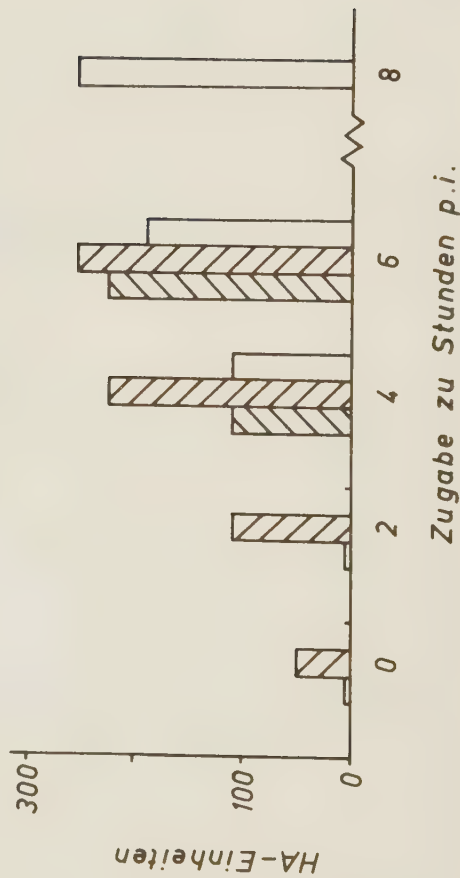


Abb. 8 Einfluß von 25 und 40 μ Acridinorange/ml MM auf die zellfreie Infektiosität des KP-Virus während der Vermehrung in Hühnerfibroblasten.

 40 μ AO/ml MM,
  25 μ AO/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der AO-Zugabe.

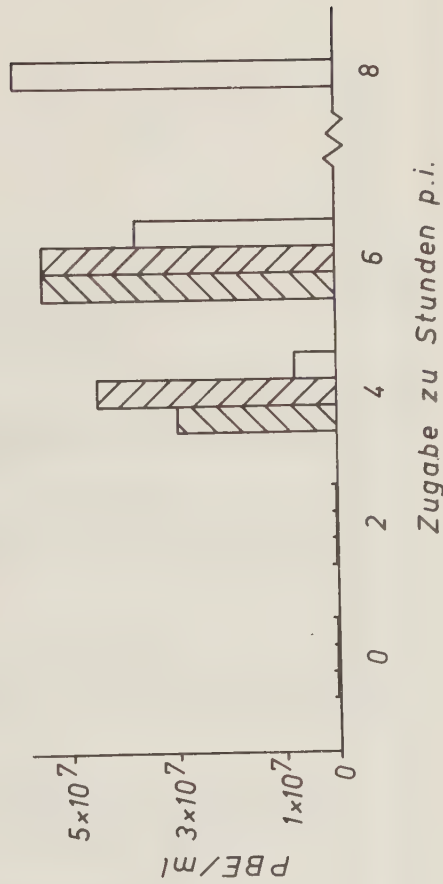


Abb. 9

Einfluß von 25 und 40 μ Acridinorange/ml MM auf die zellgebundene Infektiosität des KP-Virus während der Vermehrung in Hühnerfibroblasten.

40 μ AO/ml MM,
 25 μ AO/ml MM,
 Kontrolle zur Zeit der AO-Zugabe.

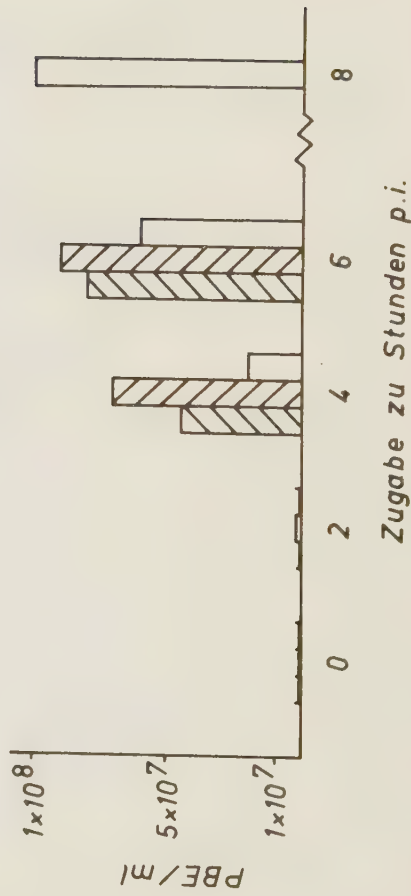
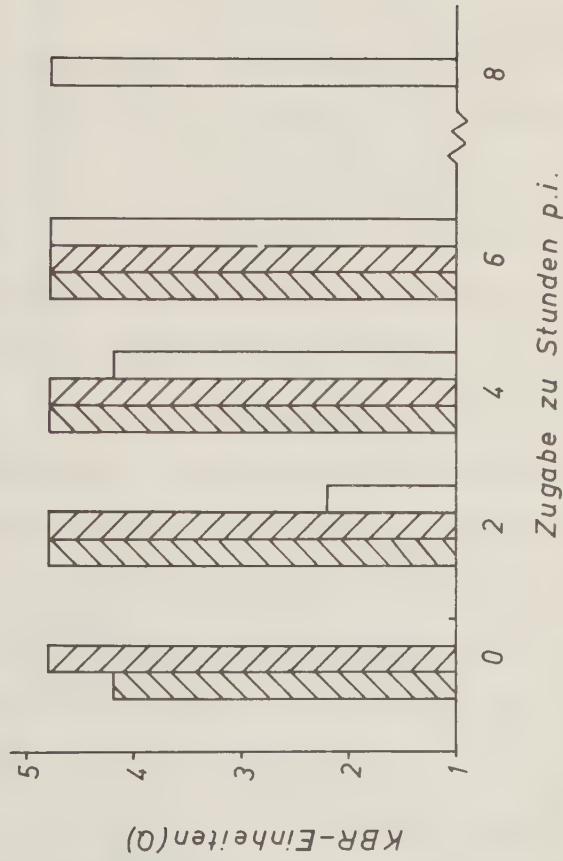


Abb. 10

Einfluß von 25 und 40 μ Acridinorange/ml MM auf die Synthese des RNP-Antigens des KP-Virus in Hühnerfibroblasten.

 40 μ AO/ml MM,
  20 μ AO/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der AO-Zugabe.



Zeit 0 p.i. zugesetzt werden, fällt im Medium von einer Proflavinkonzentration von 0 - 25 μ /ml MM der HA-Titer von 64 auf 0 HAE (= 100 %), und der Infektiositätstiter von $5,00 \times 10^6$ auf $1,00 \times 10^5$ PBE/ml (= 98 %) (Abb. 11 u. 12). Im Zell-extrakt sinkt zwischen einer Proflavinmenge von 0 - 20 μ /ml MM das Hämagglutinin von 256 auf 0 HAE (= 100 %), und die Infektiosität von $1,20 \times 10^7$ auf $1,20 \times 10^5$ PBE/ml (= 99 %) (Abb. 11 u. 12). Der KBR-Titer des RNP-Antigens bleibt bis 10 μ Proflavin/ml MM konstant auf der Höhe der Kontrolle und fällt über einen mittleren Wert bei 15 μ Proflavin/ml MM auf 0 bei 20 μ Proflavin/ml MM ab (Abb. 13). Im Stundenversuch mit zwei Proflavinkonzentrationen, 10 und 20 μ /ml MM findet bei Zugabe des Stoffes in der hohen Verdünnung zur Zeit 0 und 1 Stunde p.i. keine Bildung von zellfreiem und zellgebundenem Hämagglutinin statt (Abb. 14 u. 15). Unter einem 8-Stundenblock mit 10 und 20 μ Proflavin/ml MM wird die Infektiosität im Medium um etwa zwei Zehnerpotenzen gesenkt (Abb. 16). Bei 8 Stunden langer Inkubation mit den beiden Proflavinverdünnungen ist die Infektiosität im Zell-extrakt um etwa drei Zehnerpotenzen vermindert (Abb. 17). Mit 10 μ Proflavin/ml MM fällt der RNP-Antigentiter, außer bei Zugabe zur Zeit 0 p.i., nicht von der Höhe des Kontrollwertes ab. Bei Zusatz von 20 μ Proflavin/ml MM zur Zeit 0 und 1 Stunde p.i. sinkt die komplementbindende Aktivität des RNP-Antigens deutlich ab; bei späterer Zugabe kann der Titer des RNP-Antigens nicht mehr beeinflusst werden (Abb. 18).

Abb. 11 Dosisseffekt von Proflavin auf die Vermehrung des KP-Virus in Hühnerfibroblasten; zellfreies HA ▲-▲ , zellgebundenes HA ▲-▲ .

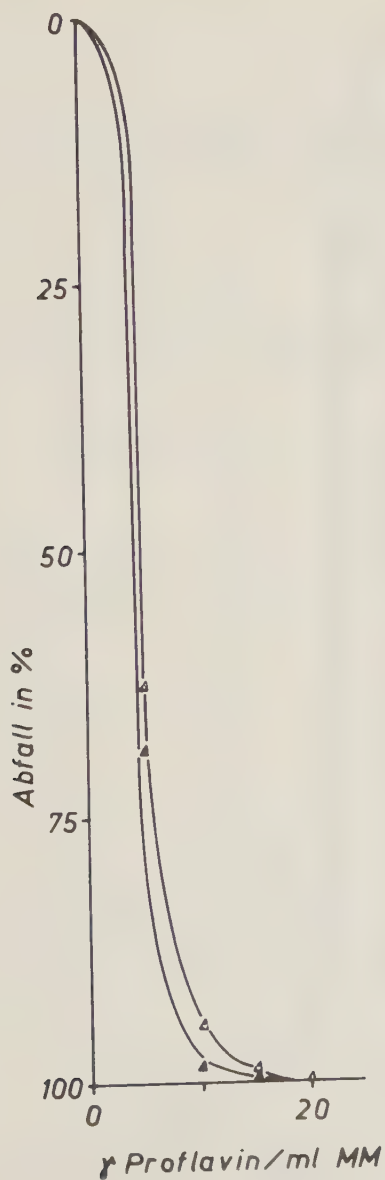


Abb. 12 Dosis-effekt von Proflavin auf die Vermehrung des KP-Virus in Hühnerfibroblasten; zellfreie Infektiosität ●-●, zellgebundene Infektiosität ○-○.

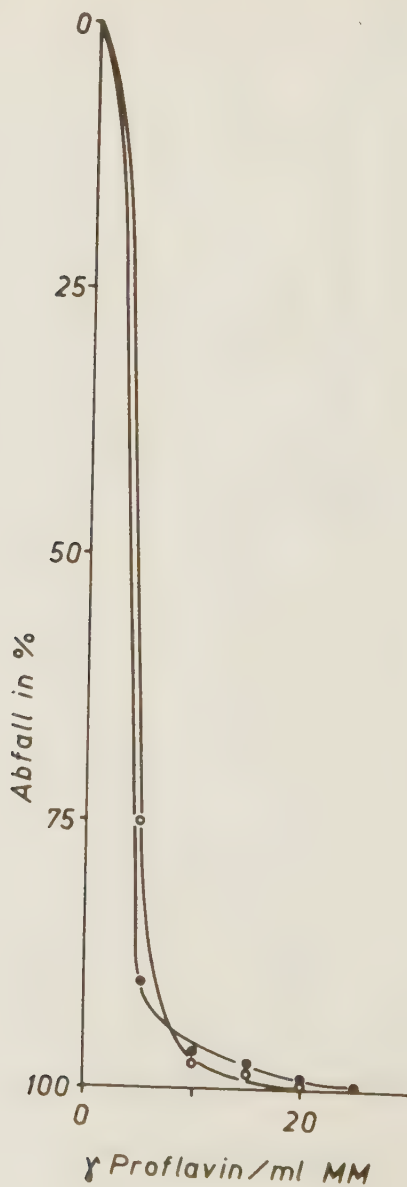


Abb. 13 Dosisseffekt von Proflavin auf die Synthese des RNP-Antigens des KP-Virus in Hühnerfibroblasten.

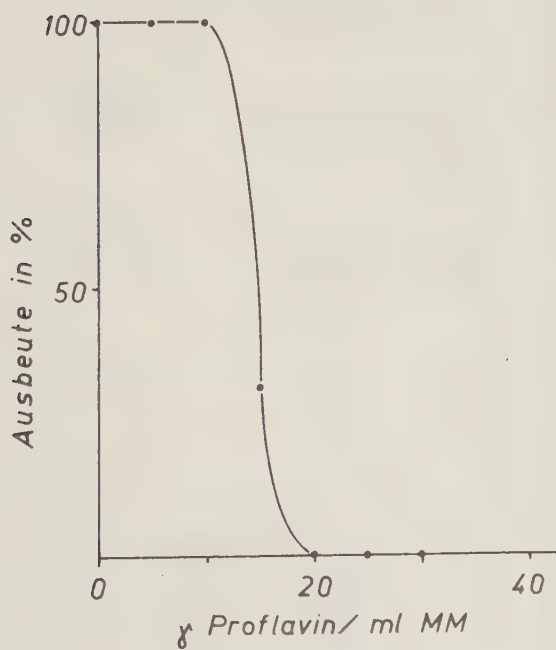


Abb. 14 Einfluß von 10 und 20 μ Proflovin/ml MM auf die Synthese des zellfreien HA des KP-Virus in Hühnerfibroblasten.
 20 μ Proflovin/ml MM,  10 μ Proflovin/ml MM,  Kontrolle zur Zeit der Proflovinzugabe.

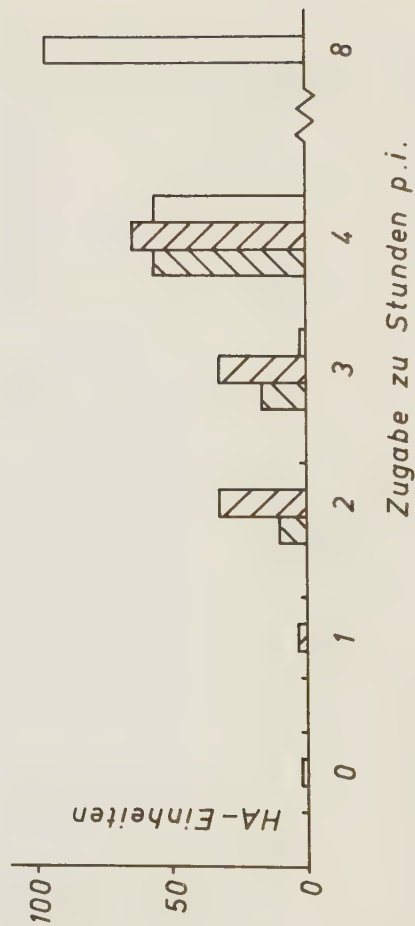


Abb. 15 Einfluß von 10 und 20 μ Proflavin/ml MM auf die Synthese des zellgebundenen HA des KP-Virus in Hühnerfibroblasten.

 20 μ Proflavin/ml MM,
  10 μ Proflavin/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der Proflavinzugabe.

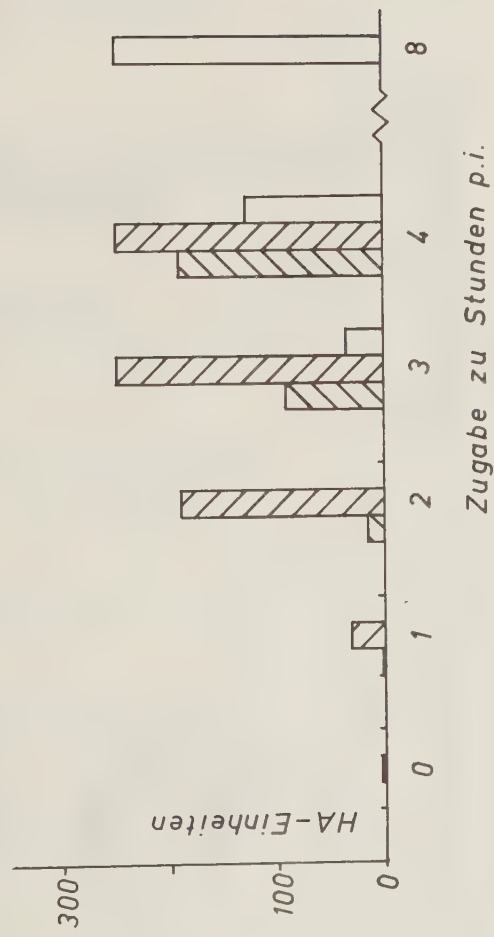


Abb. 16 Einfluß von 10 und 20 μ Proflovin/ml MM auf die zellfreie Infektiosität des KP-Virus während der Vermehrung in Hühnerfibroblasten.

 20 μ Proflovin/ml MM,
  10 μ Proflovin/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der Proflovinzugabe.

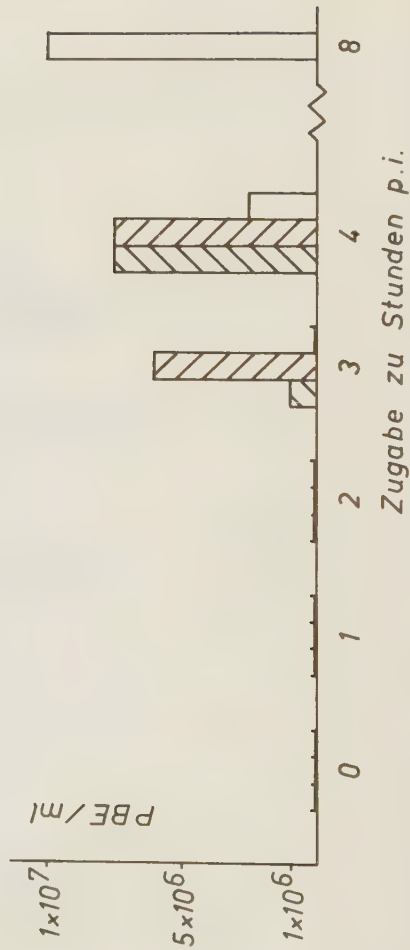


Abb. 17

Einfluß von 10 und 20 μ g Profilavin/ml MM auf die zellgebundene Infektiosität des KP-Virus während der Vermehrung in Hühnerfibroblasten.

 20 μ g Profilavin/ml MM,
  10 μ g Profilavin/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der Profilavinzugabe.

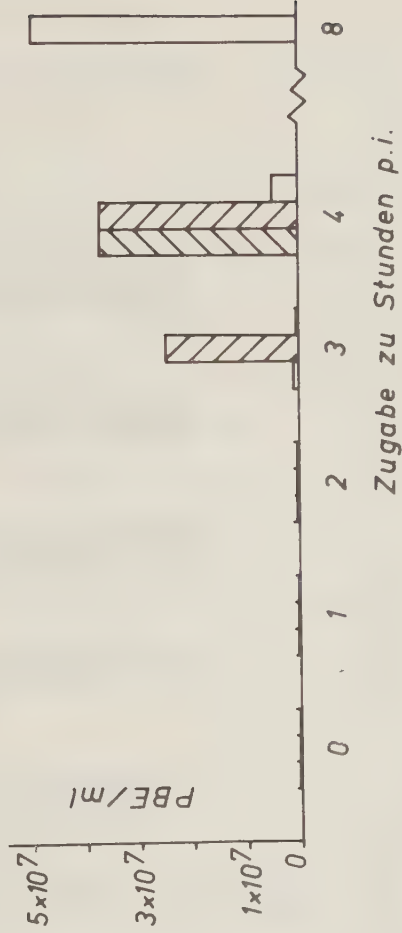
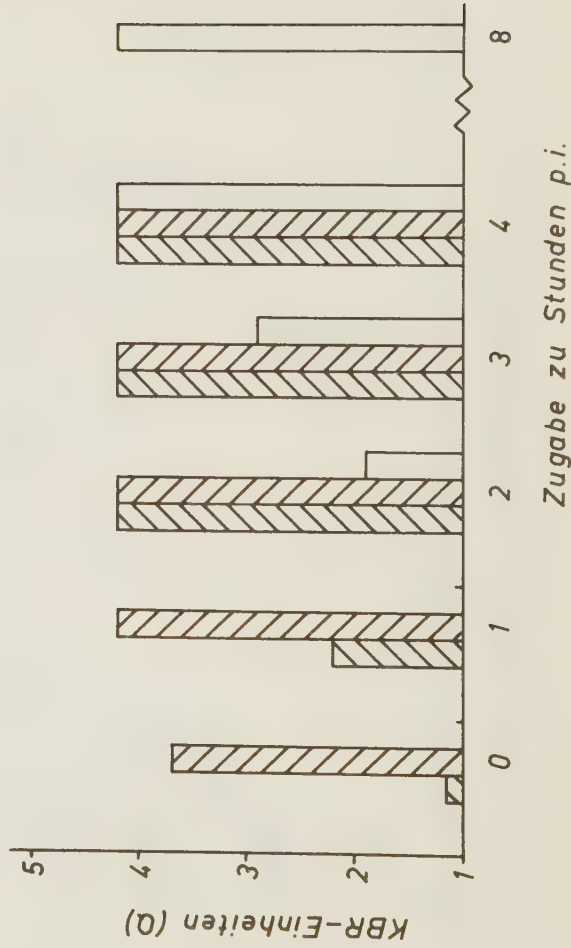


Abb. 18

Einfluß von 10 und 20 μ Proflovin/ml MM auf die Synthese des RNP-Antigens des KP-Virus in Hühnerfibroblasten.

 20 μ Proflovin/ml MM,
  10 μ Proflovin/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der Proflovinzugabe



5. Wirkung des Proflavins auf die Vermehrung des NDV

Im Versuch mit steigenden Mengen Proflavin, die mit NDV infizierten Hühnerfibroblastenkulturen zur Zeit 0 p.i. zugesetzt werden, fällt der Titer des zellfreien HA zwischen 0 - 15 μ g Proflavin/ml MM von 64 auf 0 HAE (= 100 %) (Abb. 19). Die ins Medium abgegebenen infektiösen Partikel werden von $2,00 \times 10^7$ PBE/ml in der Kontrolle bis zu $5,00 \times 10^5$ PBE/ml (= 98,4 %) bei 35 μ g Proflavin/ml MM verringert (Abb. 19). Die zellgebundene HA-Aktivität sinkt von 64 HAE bei 0 μ g Proflavin/ml MM auf 0 HAE (= 100 %) bei 35 μ g Proflavin/ml MM (Abb. 19). Bis zu dieser Proflavinmenge fällt der Titer der zellgebundenen Infektiosität von der Kontrolle mit $3,00 \times 10^7$ PBE/ml bis auf $5,00 \times 10^5$ PBE/ml (= 97 %) (Abb. 19). Die Menge RNP-Antigen bleibt bis zu 15 μ g Proflavin/ml MM konstant und sinkt dann allmählich ab, ohne innerhalb der verwendeten Proflavinverdünnungen den 0-Punkt zu erreichen (Abb. 20).

Im Stundenversuch mit zwei Proflavinkonzentrationen, 20 μ /ml MM und 50 μ /ml MM, wurde gezeigt, daß bei der Zugabe der hohen Proflavinverdünnung zur Zeit 0 und 1 Stunde p.i., bei der Zugabe der geringen Verdünnung zur Zeit 0, 1, 2 und 3 Stunden p.i., die Bildung des zellfreien Hämagglutinins vollständig gegenüber der Kontrolle mit 24 HAE gehemmt wird (Abb. 21). Die Bildung des zellgebundenen Hämagglutinins kann mit der geringen Proflavinkonzentration bei Hinzufügen zur Zeit 0 p.i. nicht ganz ausgeschaltet werden; mit der hohen Konzentration wird sie bis zum Zusetzen des Stoffes

Abb. 19 Dosisseffekt von Proflavin auf die Vermehrung des NDV in Hühnerfibroblasten; zellfreies HA $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$, zellgebundenes HA $\triangle$ - $\triangle$, zellfreie Infektiosität $\bullet$ - $\bullet$, zellgebundene Infektiosität $\circ$ - $\circ$.

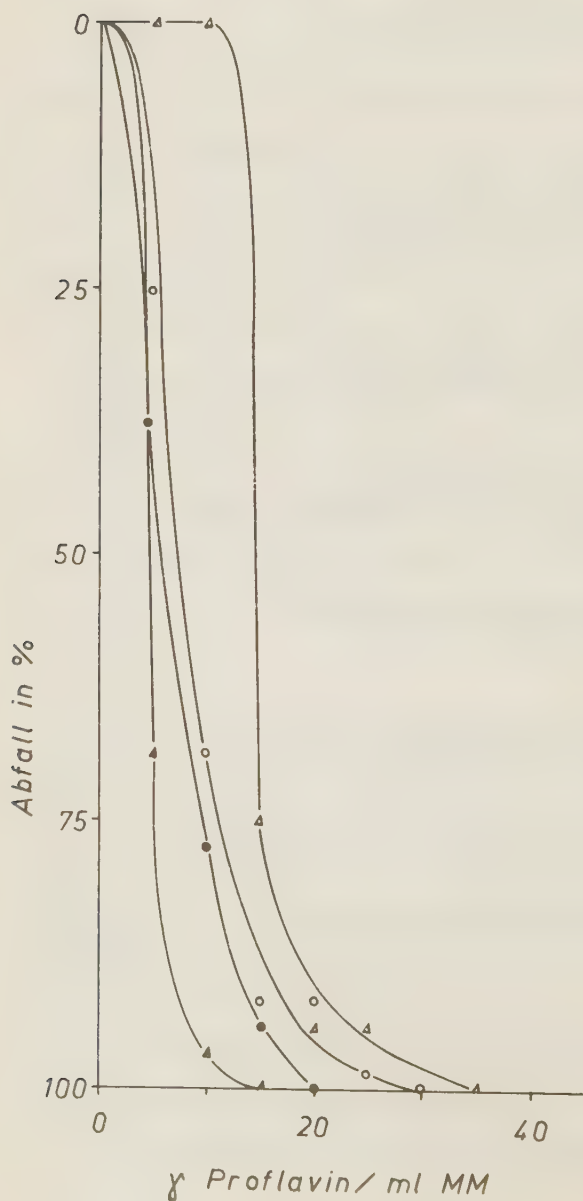


Abb. 20 Dosisseffekt von Proflavin auf die Synthese des RNP-Antigens des NDV in Hühnerfibroblasten.

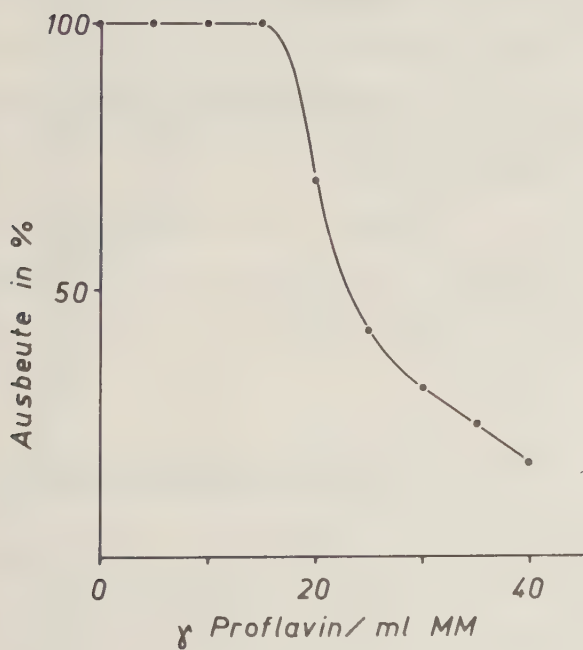
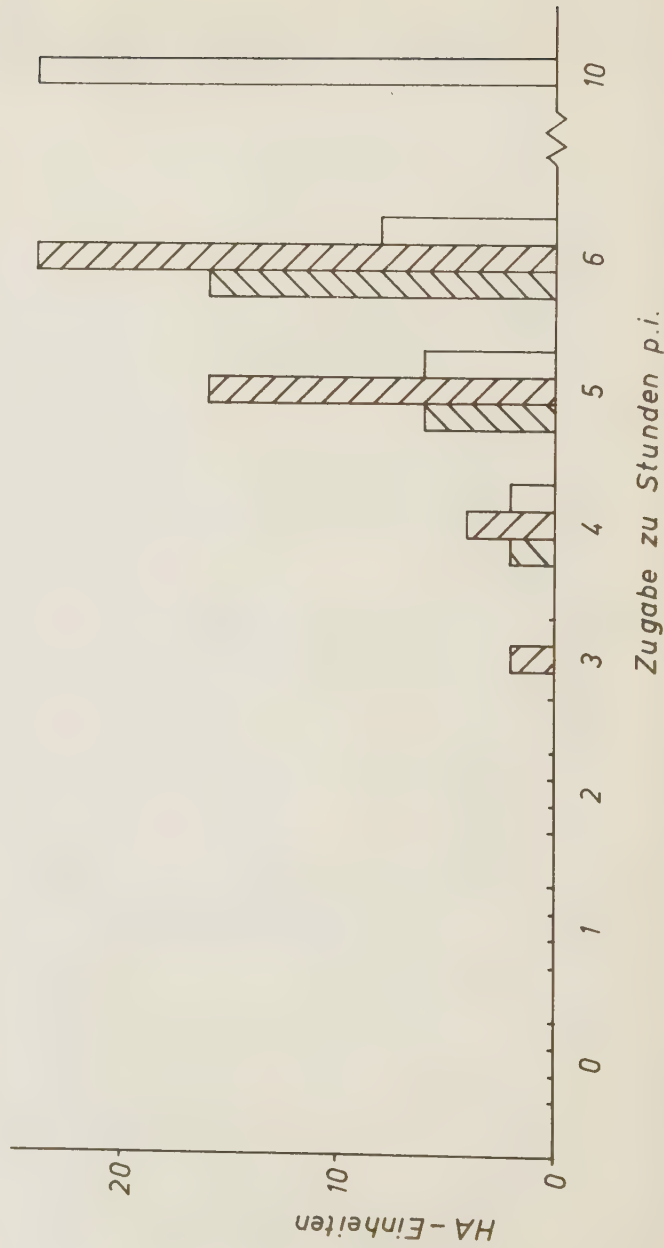


Abb. 21

Einfluß von 20 und 50 μ Profilavin/ml MM auf die Synthese des zellfreien HA des NDV in Hühnerfibroblasten.

 50 μ Profilavin/ml MM,
  20 μ Profilavin/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der Profilavinzugabe.



zur Zeit 0, 1 und 2 Stunden p.i. unterdrückt (Abb. 22). Die Infektiosität im Medium sinkt unter einem 10-Stunden-block mit 20 μ und 50 μ Proflavin/ml MM um knapp drei Zehnerpotenzen und im Zellextrakt um etwa die gleiche Menge ab (Abb. 23 u. 24). Die Bildung des RNP-Antigens wird durch Zugabe von 20 μ Proflavin/ml MM zur Zeit 0 p.i. fast vollständig gehemmt. Bei Hinzufügen dieser Proflavinmenge zur Stunde 5 p.i. kann keine Hemmung mehr erzielt werden. Mit einer Proflavinkonzentration von 50 μ /ml MM kann die Produktion des RNP-Antigens bis zum Zusatz des Stoffes bis zur Zeit 2 Stunden p.i. annähernd vollständig gehemmt werden. Bei Zugabe zur Zeit 4 Stunden p.i. kann noch eine Hemmung beobachtet werden, der RNP-Antigentiter erreicht noch nicht den Wert der Kontrolle (Abb. 25).

VI. Besprechung der Untersuchungsergebnisse

Neben der in der Einleitung schon beschriebenen Wirksamkeit und Wirkungsweise einzelner Pyrimidinbasenanaloge als Metaboliten des Nucleinsäurestoffwechsels gab auch die bekannte biologische Aktivität des Purinbasenanalogs, 6-Mercaptopurin, auf den Nucleinsäurestoffwechsel den Anlaß, eine Reihe von Pyrimidin- und Purinbasenanalogen auf ihre Wirksamkeit auf die Virusvermehrung zu untersuchen. Die Wirkung des 6-Mercaptopurins ist nicht nur experimentell bewiesen, sondern wird auch in der Therapie des Krebses angewendet (Handschumacher u. Welch, 1960).

Abb. 22

Einfluß von 20 und 50 μ Proflavin/ml MM auf die Synthese des zellgebundenen HA des NDV in Hühnerfibroblasten.

 50 μ Proflavin/ml MM,
  20 μ Proflavin/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der Proflavinzugabe.

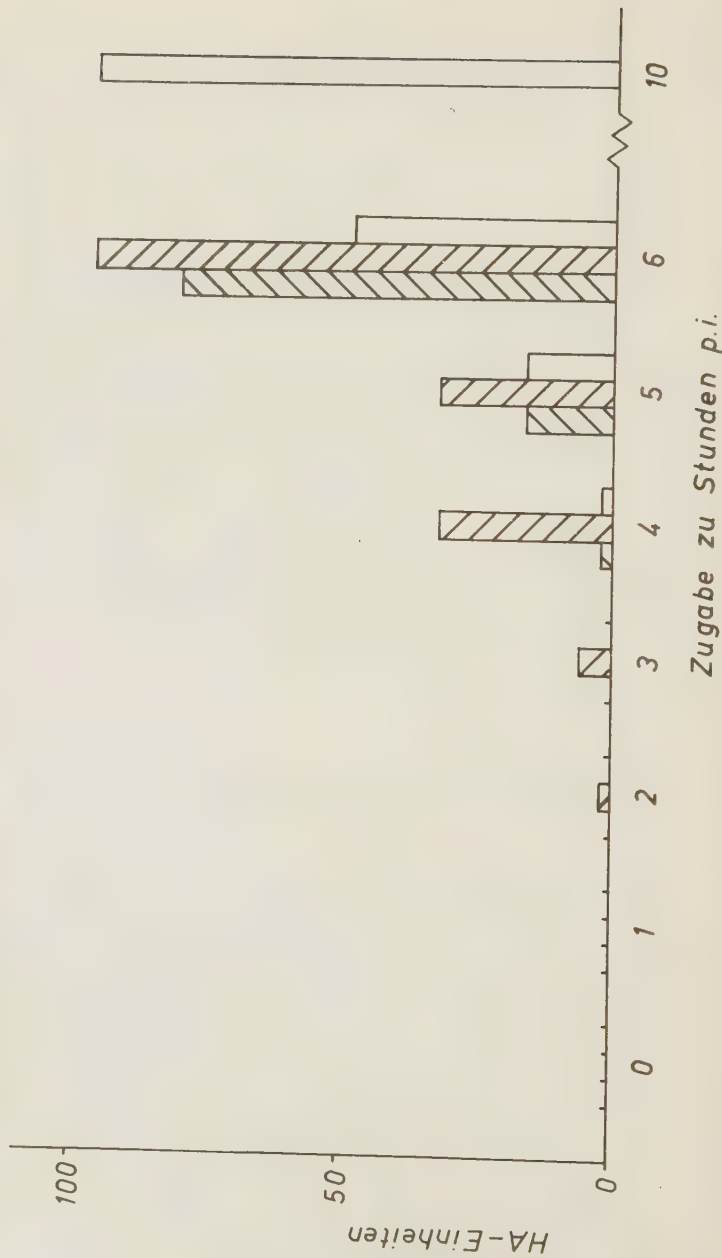


Abb. 23 Einfluß von 20 und 50 μ Proflavin/ml MM auf die zellfreie Infektiosität des NDV während der Vermehrung in Hühnerfibroblasten.

 50 μ Proflavin/ml MM,
  20 μ Proflavin/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der Proflavinzugabe.

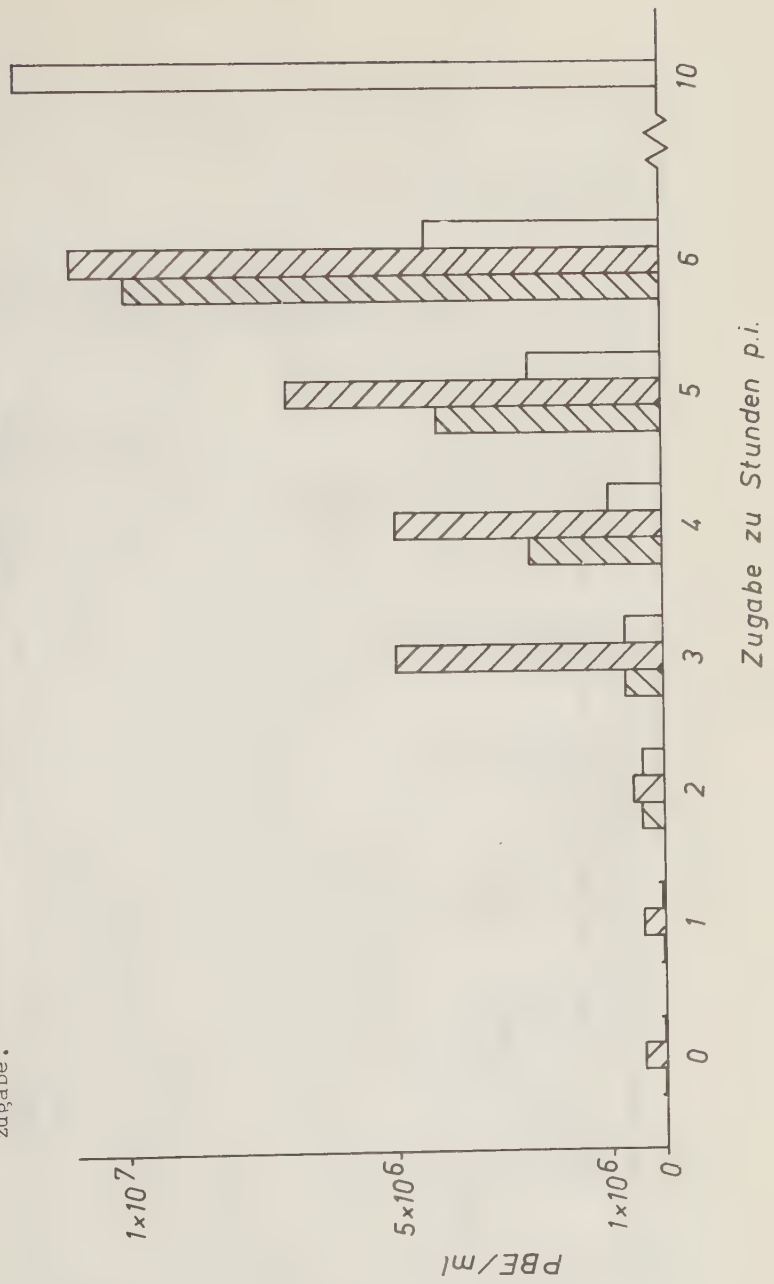


Abb. 24 Einfluß von 20 und 50 μ Proflavin/ml MM auf die zellgebundene Infektiosität des NDV während der Vermehrung in Hühnerfibroblasten.

 50 μ Proflavin/ml MM,
  20 μ Proflavin/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der Proflavinzugabe.

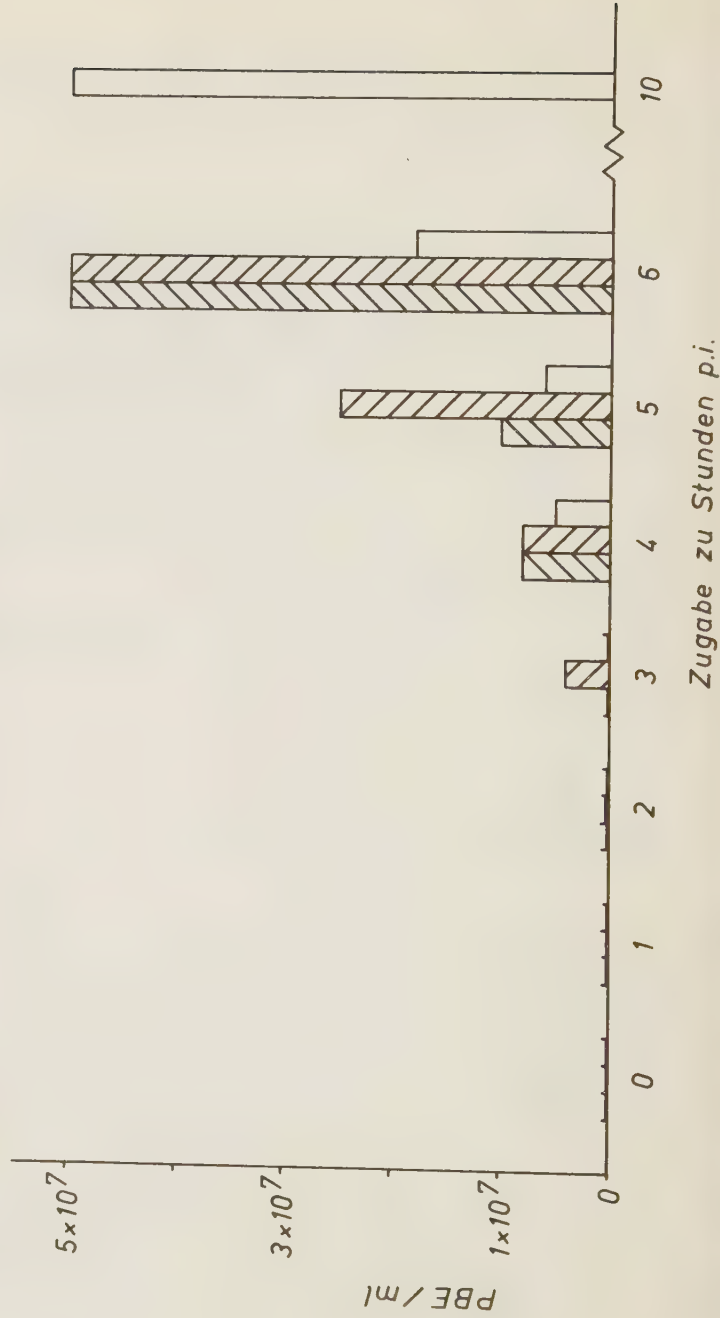
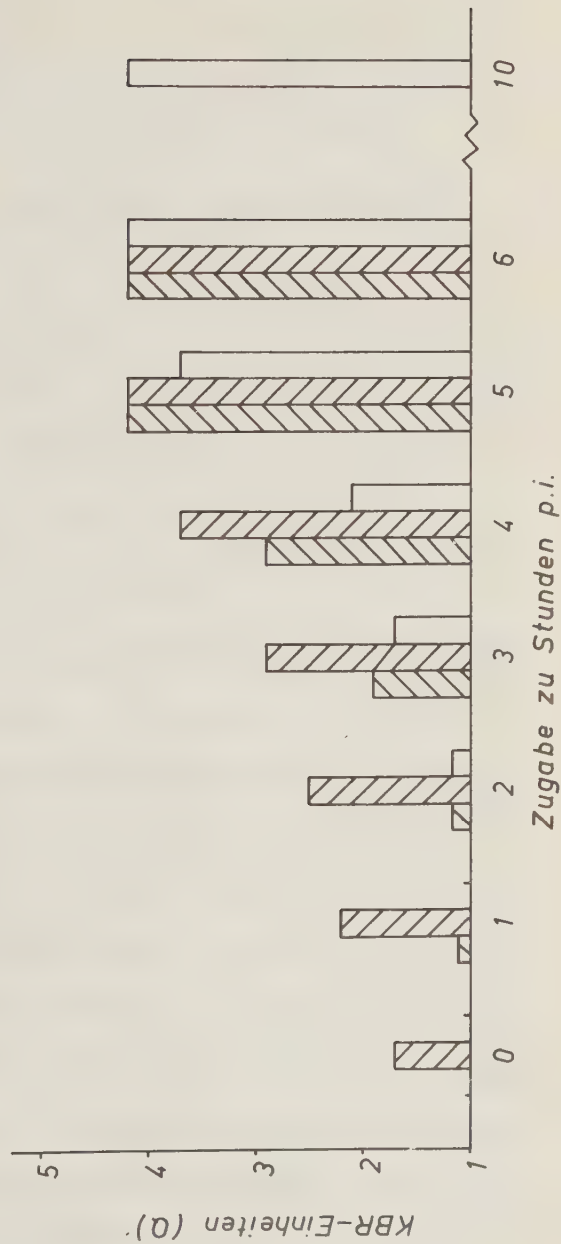


Abb. 25 Einfluß von 20 und 50 μ Profilavin/ml MM auf die Synthese des RNP-Antigens des NDV in Hühnerfibroblasten.

 50 μ Profilavin/ml MM,
  20 μ Profilavin/ml MM,
  Kontrolle zur Zeit der Profilavin-zugabe.



Die Ergebnisse der mit diesem und anderen Basenanalogen durchgeführten Versuche zeigen, daß sowohl die Pyrimidin- wie auch die Purinbasenanalogen auf die Vermehrung des KP-Virus in Hühnerfibroblasten keinen Einfluß haben.

Zur Erklärung der Befunde kann man zwei Möglichkeiten in Betracht ziehen. Es werden die Basenanaloge überhaupt nicht in die Virus-RNS eingebaut. Bei der Synthese der Virus-RNS werden also die normalen Vorläufer des zellulären "Pools" benutzt, der bei primären Fibroblasten sehr groß ist, so daß "falsche Basen" ausverdünnt werden können.

Als zweite Möglichkeit ist anzusehen, daß die Basenanaloge in die Virus-RNS eingebaut werden, daß aber weder die Eigenreplikation und die Sekundärstruktur der Virus-RNS noch ihre Botenfunktion durch diese unnatürliche Substanz beeinflusst werden.

Die Untersuchungen an HeLa-Zellen sprechen für die erste Möglichkeit. Eine unterschiedliche Wirkungsweise besteht offensichtlich bei verschiedenen Zelltypen, da eine gewisse Hemmwirkung in HeLa-Zellkulturen beobachtet werden kann. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß in HeLa-Zellen durch viele Passagen die zellulären "Pools" minimal geworden sind und eher mit Substanzen von außen angereichert werden können. Allerdings stellen HeLa-Zellen nicht das spezifische Wirtssystem für die Vermehrung des KP-Virus dar. Sie lassen nur den Ablauf eines abortiven Zyklus zu (Rott, unveröffentlichte Versuche).

Obwohl das Persantin die Penetration niedermolekularer Substanzen, wie zum Beispiel Nucleoside, durch die Zellmembran verhindert (Scholtissek, unveröffentlichte Versuche), zeigt die Substanz auf die Virusvermehrung keinen Einfluß. Es kann also auch hier angenommen werden, daß genug Vorläufermaterial in der Zelle vorhanden ist.

Acridinorange besitzt eine indirekte Wirksamkeit auf die RNS- und Proteinsynthese nichtinfizierter Zellen. Es konnte gezeigt werden, daß die Hemmwirkung nur zum Teil auf eine reduzierte Synthese der hochmolekularen RNS zurückzuführen ist, zum größten Teil aber durch die Blockierung der Penetration der RNS-Vorläufer durch das Acridinorange bedingt wird (Scholtissek u. Becht, 1966).

In diese mit normalen, nichtinfizierten Zellen erhaltenen Befunde lassen sich die hier beschriebenen Ergebnisse über den Einfluß des Acridinorange auf die Virusvermehrung einreihen. Wie Abbildung 2 und 3 ausweisen, hat die Bebrütung der bereits infizierten Zellen mit acridinorangehaltigem Medium nur einen geringen Einfluß auf die Virusvermehrung. Die Synthese der Virus-RNS wie die der normalen Zell-RNS bleibt durch die Direktwirkung nicht zu hoher Dosen des Acridinorange unbeeinflusst. Eine gewisse Hemmwirkung zeigt sich, wenn die Zellen mit Acridinorange vorinkubiert werden. Die Erklärung hierfür liegt möglicherweise in einer Beeinflussung der Adsorption bzw. der Penetration durch Acridinorange.

Nachdem Allison et al. (1963) gezeigt haben, daß lysosomale Enzyme nach der Virusinfektion aktiviert sind, und auch aus den Befunden von Zelenin (1966) hervorgeht, daß Acridinorange in den Lysosomen kumuliert, lag der Gedanke nahe, daß das Acridinorange die Aktivierung der "uncoating Prozesse" blockieren könnte. Diese Hemmung wäre eine Erklärung für die reduzierte Virussyntese, wenn die Zellen vor der Infektion mit Acridinorange angefüllt sind.

Die Experimente konnten hierfür jedoch keine Bestätigung liefern, da die Aktivierung der Lysosomen in infizierten Zellen und Kontrollen etwa gleich war. Die Möglichkeit, daß ein solcher Mechanismus eine Rolle spielt, kann trotzdem in unserem System nicht ausgeschlossen werden. Da die Fibroblasten selbst stets eine Phosphatasefärbung ergeben, kann auch das Acridinorange in unserem System und der beschriebenen Versuchsanordnung nicht eingesetzt werden, um einen weiteren Aufschluß über eine eventuelle Rolle der lysosomalen Enzyme als "uncoating enzymes" zu erhalten.

Aus der Phagenforschung ist bekannt, daß Proflavin das Wachstum von Bakteriophagen hemmt, indem es ein oder mehrere Stadien des Zusammenbaus des infektiösen Viruspartikels aus seinen vegetativen Untereinheiten blockiert (DeMars, 1955; Kellenberger u. Séchaud, 1957).

Die Virusuntereinheiten des KP-Virus sind gut charakterisiert. Das s- oder RNP-Antigen wird im Kern, das Hämagglu-

tinin im Cytoplasma synthetisiert (Breitenfeld u. Schäfer, 1957; Franklin, 1958). Da das Proflavin hauptsächlich im Cytoplasma akkumuliert (Slonimski u. Ephrussi, 1949; Stich, 1956; Werz, 1957), erscheint es möglich, daß die Synthese der im Cytoplasma gebildeten Virusuntereinheiten mehr gestört wird als die der im Kern gebildeten Komponenten.

Im Versuch mit verschiedenen Konzentrationen von Proflavin konnte gezeigt werden, daß bis zu einer Konzentration von 10 μ Proflavin/ml MM die Infektiosität und die Hämagglutination sehr deutlich abfallen, während die Synthese des RNP-Antigens noch voll weiterläuft. Erst über der oben genannten Konzentration fällt der RNP-Antigentiter rasch auf 0 ab.

Nur das Ergebnis bezüglich des RNP-Antigens steht im Einklang mit den von Franklin (1958) gefundenen Werten. Er fand den Abfall des RNP-Antigentiter bei einer Proflavinkonzentration von etwa 8,5 μ /ml. Alle anderen Ergebnisse von Franklin weichen von den hier beschriebenen ab, da der Autor nicht unter Ausschluß des Lichtes gearbeitet hat. Licht zerstört in Gegenwart von Proflavin sowohl die Virus- als auch die Zellnucleinsäuren (Schaffer, 1962; Scholtissek u. Rott, 1964). Insofern sind die von Franklin durchgeführten Experimente wertlos und ihre Interpretation falsch.

Die Wirkung des Proflavins auf die Vermehrung des NDV ist verschieden von der beim KP-Virus. Um einen Effekt zu er-

zielen, braucht man einmal höhere Proflavindosen, d.h. 20 und 50 μ /ml MM gegenüber 10 und 20 μ /ml MM beim KP-Virus (vergleiche auch Scholtissek u. Rott, 1964). Im Dosiseffektversuch ist mit 50 μ Proflavin/ml MM die RNP-Antigensynthese nicht vollständig zu hemmen. Der steile Abfall bis auf 0 wie beim KP-Virus ist hier nicht zu finden, eine Restsynthese läuft beim NDV weiter. Eine so scharfe Trennung einzelner Synthesephasen wie beim KP-Virus ist nicht möglich. Selbst die Menge RNP-Antigen steigt bei Zugabe des Inhibitors mit zunehmender Zeit p.i. unter beiden Konzentrationen langsam an.

Während beim KP-Virus verschiedene Syntheseschritte der Virussynthese klar voneinander nach dem Prinzip des Alles oder Nichts zu differenzieren sind, ist beim NDV zum anderen, bei zeitlicher Verschiebung der Zugabe des Proflavins, eine Trennung der Syntheseschritte entweder sehr undeutlich oder überhaupt nicht wahrnehmbar.

Als teilweise Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten könnten die verschiedenen Orte der Synthese der Viruskomponenten aus einzelnen Makromolekeln zu betrachten sein. Proflavin könnte Einfluß auf Transportvorgänge durch die Kernmembran bei KP-Viruskomponenten haben. Beim NDV finden, wie bereits erwähnt, alle Syntheseprozesse im Cytoplasma statt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen klar, daß Proflavin in verschiedene Phasen der Virussynthese eingreifen kann.

Das konnte sowohl durch Versuche mit unterschiedlichen Proflavinkonzentrationen als auch durch solche, bei denen der Inhibitor zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion zum virusbildenden System zugegeben wurde, dargestellt werden. Diese Experimente ergaben als prinzipiell neuen Befund, daß Proflavin mit der Bildung eines spezifischen, bisher nicht erfaßten Vorläufer der Hämaggglutinin synthese interferiert. Wie bereits erwähnt, werden nach Zugabe von 10 μ g Proflavin/ml Medium sofort nach der Infektion mit KP-Virus zwar die normale Menge an RNP-Antigen gebildet, jedoch kein Hämaggglutinin synthetisiert. Wird diese Proflavinmenge jedoch 2 - 3 Stunden p.i. zum virusbildenden System zugegeben, erhält man auch die normale Menge an Hämaggglutinin. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß die gewählte Proflavinkonzentration nur dann die Bildung des Hämaggglutinins inhibiert, wenn die Synthese eines Vorläufers des Hämaggglutinins, der nicht identisch mit dem RNP-Antigen und dem Frühprotein ist, noch nicht abgeschlossen ist. Größere Mengen an Proflavin interferieren schließlich zu jedem Zeitpunkt nach der Infektion mit der Bildung des Hämaggglutinins.

Daneben scheint das Proflavin auch einen Einfluß auf den Zusammenbau der Viruskomponenten zu neuen Viria zu besitzen, da bei relativ kleinen Inhibitorkonzentrationen unter bestimmten Bedingungen zwar alle Viruskomponenten synthetisiert werden, der Infektiositätstiter jedoch nicht entsprechend ansteigt.

VII. Zusammenfassung

Vier Pyrimidinbasenanalogue und zwei Purinbasenanalogue wurden auf ihre Wirksamkeit auf die Vermehrung von RNS-Viren am Beispiel des KP-Virus untersucht. Während der Virusvermehrung in Hühnerfibroblasten konnte keine Wirksamkeit gefunden werden. Nur in HeLa-Zellkulturen konnte eine gewisse Hemmwirkung festgestellt werden.

Für den Pyrimidinabkömmling Persantin war keine virusspezifische Inhibition nachzuweisen.

Neben dem direkten Effekt des Acridinoranges auf die Virusvermehrung wurde ein vermuteter Membraneffekt des Acridinoranges auf die Wirtszelle und damit indirekt auf die Virusvermehrung bestätigt. Eine Interferenz des Acridinoranges mit den lysosomalen Enzymen während der Freisetzung des genetischen Materials während der Eclipse konnte nicht gefunden werden.

Die verschiedene Verhaltensweise des KP-Virus und des NDV gegenüber der Wirkung des Proflavins auf die Virusvermehrung wird gezeigt. Die Unterschiede können mit den verschiedenen Synthesorten des RNP-Antigens der beiden Viren erklärt werden.

VIII. Literaturverzeichnis

1. Allison, A. C. and K. Sandelin (1963)
Virus-infected cells and its possible relationship
to cytopathic effects.
J. Exp. Med. 117, 879 - 887
2. Allison, A. C., I. A. Magnus and M. R. Young (1966)
Role of lysosomes and cell membranes in photosensiti-
zation.
Nature 209, 874 - 878
3. Andrews, C. H., F. B. Bang and F. M. Burnet (1955)
A short discription of the myxovirus group
(influenza- and related viruses).
Virology 1, 176 - 184
4. Bertalauffy, v. L. and I. Bickis (1956)
Identification of cytoplasmic basophilia (ribonucleic
acid) by fluorecence microscopy.
J. Histochem. Cytochem. 4, 481 - 493
5. Breitenfeld, P. M. and W. Schäfer (1957)
The formation of fowl plague virus antigens in in-
fected cells as studied with fluorescent antibodies.
Virology 4, 328 - 345
6. Bresch, C. (1965a)
Biochemie der Replikation von DNA.
in: Klassische und molekulare Genetik. S. 141 - 146
Erster veränderter Nachdruck.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
7. Bresch, C. (1965b)
Mutation als Molekularprozeß.
in: Klassische und molekulare Genetik. S. 157 - 161
Erster veränderter Nachdruck.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

8. Bresch, C. (1965c)
Der Triplet-Raster.
in: Klassische und molekulare Genetik. S. 216 - 220
Erster veränderter Nachdruck.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
9. Bryans, J. T., W. W. Zent, R. R. Grunert and D. C. Boughton
(1956)
1-Adamantanamine hydrochloride prophylaxis for experimentally induced A/equine 2 influenza virus infection.
Nature 212, 1542 - 1544
10. Cohen, S. S., J. K. Falks, H. D. Barners, M. R. Loeb
and J. Lichtenstein (1958)
The mode of action of 5-fluorouracil and its derivatives.
Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 1004 - 1012
11. Committee on Standard Serological Procedures in
Influenza Studies (1950)
An agglutination-inhibition test proposed as a standard
of reference in influenza diagnostic studies.
J. Immunol. 65, 347 - 353
12. Davies, W. L., R. R. Grunert, R. F. Haff, J. W. Mc-Gahen,
E. M. Neumayer, M. Paulshoch, J. C. Watts, T. R. Wood,
E. C. Hermann and C. E. Hoffmann (1964)
Antiviral activity of 1-adamantanamine (adamantadine).
Science 144, 862 - 863
13. De Mars, R. I. (1955)
The production of phage-related materials when bacteriophage development is interrupted by proflavine.
Virology 1, 83 - 99
14. Dulbecco, R. (1952)
Production of plaques in a monolayer tissue culture
by single particles of an animal virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 747 - 752

15. Eggers, H. J. and I. Tamm (1960)
Antiviral Chemotherapy.
Ann. Rev. Pharmacol. 6, 237 - 250
16. Franklin, R. M. (1958)
The synthesis of fowl plague virus products in a
proflavine-inhibited tissue culture system.
Virology 6, 525 - 539
17. Freese, E. (1963)
Molecular mechanism of mutation.
Mol. Genet. 1, 207 - 269
18. Fulton, F. and K. R. Dumbell (1949)
The serological comparison of strains of influenza virus.
J. Gen. Microbiol. 3, 97 - 111
19. Gomori, G. (1956)
Histochemical methods of acid phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 4, 453 - 461
20. Haas, R. und G. Maas (1964)
Die Wirkung von 5-Jod-2'-desoxyuridin auf die
Vermehrung von SV 40 in Gewebekultur.
Arch. ges. Virusforsch. 14, 567 - 582
21. Handschumacher, R. E. and A. D. Welch (1960)
Agents which influence nucleic acid metabolism:
IV. Structural analogs of purines and their metabolic
activity.
in: E. Chargaff and J. N. Davidson: The Nucleic
Acids III. pp. 477 - 497
Acad. Press, New York
22. Heidelberger, C. (1961)
Nucleic acid synthesis and mechanism of action of
fluoropyrimidines.
in: R. J. C. Harris: Biological Approaches of
Cancer Chemotherapy. pp. 47 - 58

23. Hennessen, W. (1955)
Über eine Influenza-Komplementbindungsreaktion für die Praxis.
Z. Hyg. Infektionskrankh. 141, 557 - 564
24. Jackson, G. G., R. L. Muldoon and L. W. Akers (1963)
Serological evidence for prevention of influenzal infection in volunteers by an anti-influenzal drug adamantanamine hydrochloride.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 703 - 707
25. Kaufmann, H. E. (1963a)
Treatment of herpes simplex and vaccinia keratitis with 5-iodo- and 5-bromo-2'-desoxyuridine.
in: M. Pollard: Perspectives in Virology III.
pp. 90 - 97
Hoeber, New York
26. Kaufmann, H. E. (1963b)
Clinical cure of herpes simplex keratitis with 5-iodo-2'-desoxyuridine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 251 - 252
27. Kellenberger, E. and J. Séchaud (1957)
Electron microscopical studies of phage multiplication. II. Production of phage-related structures during multiplication of phages T2 and T4.
Virology 3, 256 - 274
28. Koenig, H. (1963)
Intravital staining of lysosomes by dyes and metallic ions.
J. Histochem. Cytochem. 11, 120 - 125
29. Kowacs, zitiert nach Gajdos, A. (1966)
Les Lysosomes (II).
La Presse Médicale 74, 981 - 986
30. Kraus, W. und W. Schäfer (1963)
Apparatur zur Herstellung von primären Kulturen animaler Zellen.
Zbl. Vet. Med. 10, 394 - 399

31. Lerman, L. S. (1961)
Structural considerations in the interaction of DNA
and acridines.
J. Mol. Biol. 3, 18 - 30
32. Lerman, S. E. (1963)
The structure of DNA-acridine complex.
Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 94 - 102
33. Lodish, H. F. and N. D. Zinder (1966)
Replication of the RNA of bacteriophage f2.
Science 152, 372 - 377
34. Maassab, H. F. and K. W. Cochran (1964)
Rubella virus: Inhibition in vitro by adamantanamine
hydrochloride.
Science 145, 1443 - 1444
35. Muntoni, S. and B. Loddo (1963)
Attivita inibente in vitro della 5-iododesossi-
uridina verso l'adenovirus.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 39, 4 - 6
36. Orgel, A. and S. Brenner (1961)
Mutagenesis of bacteriophage T4 by acridines.
J. Mol. Biol. 3, 762 - 767
37. Raab, O. (1900)
Über die Wirkung fluoereszierender Stoffe auf Infusorien.
Z. Biol. 39, 524
38. Reda, I. M., R. Rott and W. Schäfer (1964)
Fluorescent antibody studies with NDV-infected cell
systems.
Virology 22, 422 - 425

39. Robbins, E., I. P. Marcus and N. K. Gonatas (1964)
Dye-induced ultrastructural changes in multivesicular bodies (acridine orange particles).
J. Cell Biol. 21, 49 - 62
40. Rott, R. (1962)
Untersuchungen über die Feinstruktur des infektiösen Partikels der Newcastle Disease und über die neben ihm auftretenden, nichtinfektiösen, virusspezifischen Einheiten.
Zbl. Vet. Med. 12b, 74 - 116
41. Rott, R. (1964)
Antigenicity of Newcastle disease virus.
in: R. P. Hanson: Newcastle disease virus: An evolving pathogen. pp. 135 - 145
The University of Wisconsin Press.
42. Rott, R. (1965)
Allgemeines über Viren und Rickettsien.
in: R. Haas und O. Vivell: Virus- und Rickettsieninfektionen des Menschen. S. 1 - 29
J. F. Lehmanns Verlag, München.
43. Schäfer, W. (1955)
Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und der Klassischen Geflügelpest.
Z. Naturforsch. 10b, 81 - 91
44. Schaffer, F. L. (1962)
Binding of proflavine by and photoinactivation of poliovirus propagated in the presence of the dye.
Virology 18, 412 - 425
45. Scholtissek, C. (1965)
Synthesis of an abnormal ribonucleic acid in the presence of proflavine.
Biochim. Biophys. Acta 103, 146 - 159

46. Scholtissek, C. and H. Becht (1966)
Action of acridines on RNA and protein synthesis
and on active transport in chick embryo cells.
Biochim. Biophys. Acta 123, 585 - 595
47. Scholtissek, C. and R. Rott (1961)
Influence on p-fluorophenylalanine on the production
of viral ribonucleic acid and on the utilizability
of viral protein during multiplication of fowl plague
virus.
Nature 191, 1023 - 1024
48. Scholtissek, C. and R. Rott (1964)
Binding of proflavine to the desoxyribonucleic acid
and ribonucleic acid and its biological significance.
Nature 204, 39 - 43
49. Slonimski, P. and B. Ephrussi (1949)
Action de l'acriflavine sur les levures.
V. Le système des cytochromes des mutants "petite colonie".
Ann. Inst. Pasteur 77, 47 - 63
50. Spiegelman, S., I. Haruna, I. Holland, G. Beaudreau
and D. Mills (1965)
The synthesis of a self-propagating and infectious
nucleic acid with a purified enzyme.
Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 919 - 927
51. Stanley, E. D., R. E. Muldoon, L. W. Akers and G. G.
Jackson (1965)
Evaluation of antiviral drugs: The effect of
adamantanamine on influenza in volunteers.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 130, 44 - 51
52. Stich, H. (1956)
Änderung von Kern und Polyphosphaten in Abhängigkeit
von dem Energiegehalt des Cytoplasmas bei Acetabularia.
Chromosoma 7, 693 - 707

53. Tamm, I. and H. J. Eggers (1965)
Prevention of adsorption and penetration.
in: F. L. Horsfall and I. Tamm: Viral and Rickettsial
Infections of Man. pp. 305 - 338
J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Montreal.
54. Venetta, B. D. and A. Q. Shure (1961)
Adsorption isotherm studies of unfixed S-37-A and
Ehrlich ascites tumor cells using acridine orange.
Exp. Cell Res. 24, 570 - 579
55. Werz, G. (1956)
Die Wirkung von Tryptoflavin auf Kern und Cyto-
plasma von *Acetabularia mediterranea*.
Z. Naturforsch. 12b, 559 - 563
56. Wolf, D. V. and H. C. Bubel (1964)
The disposition of lysosomal enzymes as related to
specific viral cytopathic effects.
Virology 24, 502 - 505
57. Zelenin, A. V. (1966)
Fluorescence microscopy of lysosomes and related
structures in living cells.
Nature 212, 425 - 427

Herrn Professor Dr. R. Rott danke ich für seine
Anleitung und das große Interesse, das er meiner
Arbeit entgegenbrachte.

Herrn Priv.Doiz. Dr. C. Scholtissek sowie Herrn
Dr. H. Becht gilt mein besonderer Dank für ihre
vielseitige Hilfe, die sie mir jederzeit ge-
währten.

Lebenslauf

Am 6. August 1934 wurde ich, Günter Hahn, als Sohn des Alfred Hahn und dessen Ehefrau Anna Margarete, geb. Meister, in Gießen geboren.

Von 1940 - 1944 besuchte ich die Pestalozzischule in Gießen. Nach der Evakuierung im Jahre 1945 trat ich 1946 in die Sexta des Alten Realgymnasiums in Gießen ein, wo ich am 2. März 1955 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1955 - 1956 studierte ich zwei Semester Naturwissenschaften an der Philipps-Universität in Marburg. Das Studium der Veterinärmedizin begann ich im Sommersemester 1956 an der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Im Sommersemester 1959 ging ich an die Tierärztliche Hochschule in Hannover, wo ich die tierärztliche Vorprüfung ablegte. Ich setzte das Studium an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, außer einem Semester, das ich an der Justus Liebig-Universität in Gießen studierte, fort. Die tierärztliche Prüfung schloß ich am 30. März 1963 an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover ab.

Nach meiner Praktikantenzeit erhielt ich am 1. Januar 1964 die Approbation als Tierarzt. Seitdem war ich als Assistent und Vertreter in der tierärztlichen Praxis tätig. Im Sommer 1965 leistete ich den dreimonatigen Kursus in der Schlacht-tier- und Fleischbeschau für die Zulassung zur Prüfung für den tierärztlichen Staatsdienst am Schlachthof in Gießen ab.

Seit November 1965 arbeite ich am Institut für Virologie der Justus Liebig-Universität in Gießen an meiner Dissertation.

Es ist zu erwarten, dass die Ergebnisse der Untersuchungen in diesem Bereich in den nächsten Jahren noch weiter ausgebaut werden können.

Die Ergebnisse der Untersuchungen in diesem Bereich sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen in diesem Bereich. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen in diesem Bereich sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen in diesem Bereich sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

